

Série A, n° 235.

N° D'ORDRE

854



THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

M. LOUIS MARMIER

Ancien élève de l'École normale supérieure,
Boursier du Conseil général de la Seine, à l'Institut Pasteur.

1^{re} THÈSE. — SUR LA TOXINE CHARBONNEUSE.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 11 juin 1895, devant la Commission d'examen.

MM. G. BONNIER, *Président.*

DASTRE. } *Examineurs.*
MUNIER-CHALMAS, }

SCEAUX

IMPRIMERIE CHARAIRE ET C^{ie}

68-70, RUE HOUDAN, 68-70

—
1895

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

ACADÉMIE DE PARIS

FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

MM.

DOYEN		DARBOUX, professeur. Géométrie supérieure.
PROFESSEUR HONORAIRE	}	PASTEUR.
		DE LACAZE-DUTHIERS. Zoologie, Anatomie, Physiologie com- parée.
		HERMITE Algèbre supérieure.
		TROOST Chimie.
		FRIEDEL Chimie organique.
		TISSERAND Astronomie
		LIPPMANN Physique.
		HAUTEFECILLE Minéralogie.
		BOUTY Physique.
		APPELL Mécanique rationnelle.
		DUCLAUX Chimie biologique.
PROFESSEURS		BOUSSINESQ. Mécanique physique et expérimentale.
		PICARD Calcul différentiel et intégral.
		POINCARÉ. Calcul des probabilités, Physique mathématique.
		YVES DELAGE Zoologie, Anatomie, Physiologie com- parée.
		BONNIER Botanique.
		DASTRE Physiologie.
		DITTE Chimie.
		MUNIER-CHALMAS . . . Géologie.
		GIARD Zoologie, Évolution des êtres organisés.
		WOLF Astronomie.
		CHATIN Zoologie, Anatomie, Physiologie com- parée.
PROFESSEURS ADJOINTS		JOLY Chimie.
		PELLAT Physique.
		KOENIGS Cinématique.
		PAINLEVÉ Calcul différentiel et intégral.
SECRÉTAIRE		FOUSSEREAU.

Série A, n° 235.

N° D'ORDRE

854

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

M. LOUIS MARMIER

Ancien élève de l'École normale supérieure,
Boursier du Conseil général de la Seine, à l'Institut Pasteur.

1^{re} THÈSE. — SUR LA TOXINE CHARBONNEUSE.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

ACAD.
UGD.BAT
BIBL.

Soutenues le 2^e juin 1895, devant la Commission d'examen.

MM. G. BONNIER, *Président*.

DASTRE. } *Examineurs.*
MUNIER-CHALMAS, }

SCEAUX

IMPRIMERIE CHARAIRE ET C^{ie}

68-70, RUE HOUDAN, 68-70

1895

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE, DE MA MÈRE

A MA TANTE

Mademoiselle Annette LEJEUNE



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A MONSIEUR LE DOCTEUR E. ROUX

Chef de service à l'Institut Pasteur.

Hommage de profonde reconnaissance et de respectueux attachement.

SUR LA TOXINE CHARBONNEUSE

PAR LOUIS MARMIER

Ancien élève de l'École normale supérieure
Boursier du Conseil général de la Seine à l'Institut Pasteur.

HISTORIQUE

Au mois d'août 1880, M. Toussaint annonça dans le *Bulletin de l'Académie de médecine* qu'il vaccinait des moutons contre le charbon avec les produits élaborés par la bactériémie dans le sang d'un animal mort charbonneux. M. Toussaint chauffait du sang charbonneux pendant 10 minutes à 55°. Il inoculait ensuite 3 à 6 c. c. de ce sang ainsi chauffé sous la peau de moutons, auxquels il donnait le charbon 12 jours après. Il arrivait que des animaux mouraient quelquefois du charbon typique après la seule inoculation du sang chauffé. M. Toussaint attribuait ces succès à la présence de spores dans le sang charbonneux avant le chauffage, car, selon lui, ce procédé détruisait toutes les bactéries. Il concluait que l'immunité contre le charbon peut être produite, en dehors de l'action directe des microbes vivants, par l'introduction des substances élaborées par ces microbes, cause de la maladie.

Cette conclusion, pour la plupart des expériences de M. Toussaint, n'était pas démontrée. MM. Pasteur, Chamberland et Roux¹ montrèrent en effet, que ce chauffage ne tuait pas sûrement toutes les bactéries du sang charbonneux. Celles qui avaient résisté, modifiées dans leur vitalité, ne tuaient plus, mais pouvaient donner l'immunité à la manière d'un virus atténué.

Plus tard, MM. Roux et Chamberland², reprenant les expé-

1. PASTEUR, CHAMBERLAND ET ROUX, Comptes rendus de l'Académie des sciences, mars 1881.

2. ROUX ET CHAMBERLAND, *Annales Institut Pasteur*, II, 1888, p. 405.

riences de M. Toussaint, se mirent à l'abri des causes d'erreur signalées dans le travail de ce dernier. Ils montrèrent alors, d'un façon rigoureuse, que le sang des animaux charbonneux, soigneusement privé de tout organisme vivant par chauffages successifs, peut donner une immunité passagère à des moutons neufs. C'est là le premier exemple bien établi d'une immunisation contre le charbon par des substances chimiques. Mais les essais faits pour retirer du sang charbonneux cette substance immunisante n'ont pas abouti.

Pour isoler une substance immunisante contre le charbon, les expérimentateurs qui ont suivi se sont adressés aux cultures de la bactériodie dans différents milieux et à diverses températures suivant les observateurs. Chacun laisse la culture à elle-même plus ou moins longtemps, puis cherche à en retirer le principe toxique ou immunisant de la bactériodie, en produisant dans le milieu, préalablement filtré, un coagulum, soit au moyen de l'alcool, soit au moyen du sulfate d'ammoniaque en plus ou moins grande quantité. Le précipité est alors séparé par filtration, puis dialysé s'il a été obtenu par le sulfate d'ammoniaque. La substance à laquelle on aboutit finalement est inoculée à des animaux pour rechercher son pouvoir toxique ou immunisant.

Ainsi, M. Hankin¹ retire des cultures de bactériodie dans une solution d'extrait de viande de Liebig additionnée de fibrine une albumose non toxique pour les souris, lapins et cobayes. Employée à la dose de un millionième de leur poids pour les souris, cette albumose leur donne une immunité immédiate contre le charbon ; une plus forte dose favorise le développement de la maladie.

MM. Brieger et Fraenkel² obtiennent une toxalbumine très soluble dans l'eau, ayant les réactions de l'albumine et très toxique.

M. Sidney Martin³ trouve dans les cultures de charbon faites 10 à 15 jours dans une solution d'alcali albumine : une proto-

1. HANKIN, On immunity produced by an Albumose isolated from Anthrax cultures. (*British medical Journal*, 12 octobre 1889, p. 840.) — Id., On the conflict between the organism and the microbe. (*British medical Journal*, 12 juillet 1890.)

2. BRIEGER ET FRAENKEL, *Untersuchungen über Bacteriengifte*. (*Berl. klin. Wochens.* 1890, nos 41 et 42, p. 244 et 268.)

3. SIDNEY MARTIN, The chemical products of the Growth of *Bacillus anthracis* and their physiological action. (*Proceedings of the Royal society*, 22 mai 1890, p. 78.)

albumose, une deutéroalbumose, un alcaloïde, tous trois fortement alcalins. Les albumoses étaient toxiques à la dose de 3 décigrammes pour la souris et l'alcaloïde à la dose de 10 à 15 centigrammes. L'ébullition des albumoses diminue leur toxicité sans la détruire.

M. Lando Landi¹ obtient des corps n'ayant ni toxicité bien nette ni pouvoir vaccinal.

M. J. de Christmas², en cultivant 5 à 6½ jours la bactériodie dans un milieu composé de jaune d'œuf, d'albumine d'œuf et de bouillon de veau faiblement alcalin en parties égales, obtient par filtration un liquide ayant quelque propriété immunisante passagère.

M. Petermann³ fait des cultures dans le milieu employé précédemment par M. Hankin : la substance qu'il en retire n'a pas la moindre propriété immunisante.

MM. Hankin et Wesbrook⁴ emploient plusieurs milieux : pommes de terre, gélose, albumine d'œuf, extrait de viande de Liebig additionné de fibrine, peptone, etc., la plupart sans résultat. Les deux derniers modes de culture leur donnent une albumose ayant un pouvoir immunisant très grand à condition que les animaux soient inoculés avec le charbon très peu de temps après l'injection de l'albumose. L'immunisation se manifeste presque exclusivement par une survie des animaux traités sur les animaux témoins.

Les animaux réfractaires au charbon sont très sensibles à cette albumose, qu'elle ne produit aucun effet toxique sur les animaux pouvant prendre le charbon.

On voit, par ce résumé, que des moyens d'extraction en apparence semblables ont abouti entre les mains d'expérimentateurs différents à des substances de propriétés fort diverses. Cela n'a rien d'étonnant si l'on remarque que le procédé de préparation de cette toxine repose sur un phénomène de coagu-

1. LANDO LANDI, Sur les substances toxiques produites par la bactériodie charbonneuse. (*Comptes rendus Société biologie*, 1891, p. 632.)

2. J. DE CHRISTMAS, Sur les substances microbicides du sérum et des organes d'animaux à sang chaud. (*Annales Institut Pasteur*, V, 25 août 1891, p. 487.)

3. PETERMANN, Recherches sur l'immunité contre le charbon au moyen des albumoses extraites des cultures. (*Annales Institut Pasteur*, 1892, VI, p. 32.)

4. E. HANKIN ET F. WESBROOK, Sur les albumoses et les toxalbumines sécrétées par le bacille charbonneux. (*Annales Institut Pasteur*, VI, p. 633-650.)

lation au sein d'une masse liquide. Or, l'on sait combien ces phénomènes de coagulation sont mal connus, présentent un haut degré de contingence, se trouvant changés par l'intervention de causes très petites, dont on n'aurait pas pu *a priori* soupçonner l'importance. Telles sont : de faibles variations de la température, de très minimes différences dans la nature et dans la proportion des sels minéraux contenus dans la liqueur, dans le degré d'acidité ou d'alcalinité, etc.

Il s'ensuit qu'un même expérimentateur, opérant avec des liquides qu'il croit identiques, peut ne pas toujours obtenir les mêmes résultats. En outre, dans le cas particulier d'une toxine microbienne, comme la toxine charbonneuse, s'ajoutent au phénomène d'autres raisons de complexité, résultat du développement du microbe. Le milieu, la température à laquelle a été faite la culture, le temps pendant lequel elle a été abandonnée à elle-même¹ sont des facteurs que l'on ne saurait négliger. On s'explique donc bien que tous les observateurs n'aient pas eu les mêmes résultats; mais il n'en est pas moins vrai que l'on peut encore se poser la question suivante : existe-t-il dans les cultures de la bactériodie charbonneuse, une toxine à laquelle on puisse attribuer quelques-uns des symptômes de la maladie, et jouant un rôle dans l'évolution de la maladie elle-même? A ce sujet, le dernier travail cité, celui de MM. Hankin et Westbrook aboutit à une conclusion singulière, en désaccord avec ce qu'on croit savoir pour d'autres maladies infectieuses : les animaux réfractaires au charbon sont les plus sensibles à la toxine du microbe qui produit la maladie; et inversement cette substance n'est aucunement un poison pour les animaux sensibles au charbon. De plus, d'après ces savants, en inoculant à un animal une dose extrêmement faible de cette toxine, on obtiendrait une immunité immédiate contre le charbon.

Les recherches faites sur d'autres toxines microbiennes n'ont pas jusqu'à présent conduit à des résultats analogues. Les animaux sensibles aux maladies microbiennes ne sont pas en général réfractaires aux toxines produites par les microbes dans les milieux de culture. Sous ce rapport la bactériodie donnerait nais-

1. L. PERDRIX, Sur la transformation des matières azotées dans les cultures de bactériodie charbonneuse. (*Annales Institut Pasteur*, II, 1888, p. 354.)

sance à un produit n'ayant aucune analogie avec les autres produits similaires. Il en serait de même pour la question de l'immunisation. Quand on accoutume en effet peu à peu les animaux aux autres toxines microbiennes, on arrive à leur conférer l'immunité contre la maladie produite par les microbes; mais cette immunité, contrairement à celle donnée par les virus atténués, est longue et pénible à acquérir, et le plus souvent dure peu. La façon dont agirait la toxine charbonneuse, d'après les recherches de M. Hankin, ressemblerait plus au mode d'action des antitoxines que des toxines elles-mêmes.

Aussi était-il peut-être indiqué d'entreprendre de nouvelles expériences pour rechercher s'il ne serait pas possible, dans certaines conditions, d'extraire des cultures de la bactériodie charbonneuse un corps ayant quelque analogie avec les toxines produites par d'autres microbes. C'est ce que j'ai tenté en cultivant la bactériodie dans divers milieux et en comparant les propriétés toxiques ou immunisantes du milieu avant et après la culture.

Dans ce travail, j'indiquerai d'abord la préparation du milieu de culture qui m'a permis de recueillir une substance toxique produite par la bactériodie charbonneuse, puis le mode d'isolement de ce produit. Je donnerai ensuite quelques-unes des réactions chimiques du corps ainsi obtenu, les effets physiologiques de son inoculation aux lapins et à diverses espèces animales; les différences que l'on observe dans ces effets suivant les conditions de production de la toxine; les altérations que subit cette substance sous l'influence de certains agents physiques ou chimiques; des essais d'immunisation des animaux contre la maladie microbienne au moyen de la toxine. J'exposerai ensuite les divers résultats que m'ont donnés d'autres milieux de culture au point de vue de la production de ce corps. Je chercherai enfin à quoi peut être due l'apparition de cette toxine dans les conditions où je l'ai obtenue.

Ces recherches ont été faites à l'Institut Pasteur sous la direction de M. le Dr E. Roux. Que mon excellent maître me permette de lui exprimer ici ma profonde reconnaissance pour les bienveillants conseils qu'il n'a cessé de me prodiguer pendant l'exécution de ce travail.

CULTURE SUR PEPTONE

Dans leur mémoire sur la toxine charbonneuse, MM. Hankin et Westbrook ont retiré leur toxalbumose de cultures dans un milieu de peptone pure, préparée par un procédé long et pénible. Il m'a semblé plus simple de chercher à isoler de la peptone du commerce la peptone qu'elle peut contenir et qui s'y trouve mélangée à des quantités variables d'albumoses.

Pour isoler ces albumoses de la peptone, jé me suis servi du sulfate d'ammoniaque. Pour me débarrasser ensuite de ce sel, j'ai employé deux procédés différents.

1^{er} procédé. — Une certaine quantité de peptone commerciale ayant été dissoute dans l'eau, j'ajoute à la solution du sulfate d'ammoniaque en quantité telle que la liqueur en soit certainement saturée à 100°. Je fais bouillir et je filtre après quelque temps d'ébullition. Les albumoses se coagulent et le liquide filtré ne contient plus de matière précipitable par le sulfate d'ammoniaque. On soumet ce liquide à la dialyse dans un courant d'eau pendant une quarantaine d'heures. J'obtiens ainsi une liqueur contenant assez peu de sulfate d'ammoniaque pour qu'il n'entrave pas le développement de la bactériodie. La solution de peptone ainsi préparée était alcalinisée avec du carbonate de soude, étendue d'eau, ou concentrée par la chaleur, de façon à contenir environ 3 pour cent de peptone, répartie dans des ballons, et stérilisée à 115°.

Ce milieu ainsi préparé n'est pas toxique pour les animaux ; il n'a pas non plus de propriétés immunisantes. Les ballons, une fois stérilisés, ont étéensemencés avec du sang provenant d'un lapin mort du charbon en moins de trente heures.

2^e procédé. — La dialyse a l'inconvénient de laisser perdre une grande quantité de peptone. De plus, il est très difficile d'éliminer complètement le sulfate d'ammoniaque de la solution.

J'ai évité ces inconvénients en ajoutant à la liqueur la quantité d'hydrate de baryte nécessaire pour précipiter tout l'acide sulfurique qu'elle contient en combinaison. La réaction est facilitée et l'ammoniaque chassée en portant le tout pendant plusieurs heures à une température voisine de l'ébullition. Le liquide est alors séparé du précipité de sulfate de baryte. Je le porte quelque temps à l'ébullition et j'y fais passer en même

temps d'abord un courant d'air de façon à en éliminer l'ammoniaque, puis un courant d'acide carbonique destiné à précipiter la baryte qui peut avoir été mise en excès. Une fois toute la baryte précipitée, je filtre.

J'obtiens ainsi une solution contenant toute la peptone qui se trouvait dans l'échantillon employé et débarrassée de sulfate d'ammoniaque. La peptone commerciale, dont je me suis servi finalement, contenait 32,7 pour cent de cette peptone purifiée (séchée à 120°) avec 0,3 de cendres ¹.

Avec la solution de peptone ainsi préparée je fais le milieu suivant :

Eau.....	1.000 grammes.
Peptone.....	40 —
Sel marin.....	15 —
Phosphate de soude.....	0gr,5
Phosphate de potasse.....	0gr,2
Glycérine officinale.....	40 grammes.

La liqueur est filtrée, répartie dans des ballons Pasteur de 250 c. c. et finalement stérilisée à 110°.

Ce milieu ainsi préparé n'est pas toxique pour les animaux, et je ne lui ai pas trouvé non plus de propriétés immunisantes contre le charbon.

Les ballons ont été ensemencés avec du charbon virulent. La virulence du bacille dont je me suis servi avait été exaltée par une série de passages de lapin à lapin. Un tiers de c. c. d'une culture en bouillon âgée de 24 heures, inoculé sous la peau d'un lapin, tuait dans la majorité des cas cet animal en moins de 30 heures. J'ai ainsi fait des cultures à diverses températures; mais le mode d'extraction de la toxine sèche, ayant été toujours le même quelles que soient les conditions extérieures de la culture, je l'indiquerai d'abord une fois pour toutes.

Mode d'extraction de la toxine sèche. — Une fois la culture de charbon suffisamment développée dans le milieu de peptone, le liquide était filtré et saturé de sulfate d'ammoniaque à la température ordinaire. Il se produit un précipité plus ou moins abondant suivant les cultures. Je laisse la coagulation se faire pendant une quinzaine d'heures, puis le liquide est filtré. Je lave le pré-

1. La peptone commerciale de cet essai était de la peptone spongieuse fournie par la maison ~~Chassaing~~ de Paris.

Chassaing

cipité laissé sur le filtre avec une solution saturée de sulfate d'ammoniaque.

1^{re} méthode. — Pour la suite des opérations, tant que j'ai employé le premier procédé pour la préparation du milieu de culture, j'ai dissous dans l'eau le précipité resté sur le filtre ; éliminé autant que possible le sulfate d'ammoniaque dans un courant d'eau pendant une quinzaine d'heures. Le liquide du dialyseur était ensuite concentré dans le vide en présence de l'acide sulfurique, puis précipité par l'alcool fort. Le précipité était lavé à l'alcool absolu, puis séché.

2^e méthode. — Quand le milieu de culture a été préparé par le deuxième procédé, j'ai séparé la plus grande partie du sulfate d'ammoniaque du précipité resté sur le filtre, en le traitant par de la glycérine en quantité aussi faible que possible. Après deux jours de contact, le liquide glycérique était décanté, puis je remettais un peu de glycérine pour laver les corps non dissous et je décantais de nouveau. Il se dissout bien ainsi un peu de sulfate d'ammoniaque, mais en quantité minime ; et les doses qu'on en inoculerait ainsi aux animaux ne sont nullement toxiques par elles-mêmes. On peut d'ailleurs diminuer encore cette quantité de sulfate en mettant la solution de glycérine pendant quelque temps dans un dialyseur. Ceci fait, la liqueur est mise au contact de 4 fois son volume d'alcool fort. Le précipité ainsi obtenu est filtré, lavé à l'alcool absolu, puis à l'éther, et enfin desséché dans le vide. On peut recommencer plusieurs fois cette suite d'opérations en redissolvant le précipité dans un peu de glycérine.

Cultures à 36°. — A cette température, la bactériodie pousse assez bien dans la solution de peptone. La culture y est abandonnée à elle-même pendant une dizaine de jours, puis elle sert à l'extraction de la toxine sèche.

J'ai finalement une poudre grisâtre, assez soluble dans l'eau ; la solution aqueuse est neutre aux réactifs colorés.

La solubilité dans l'eau de cette substance est beaucoup diminuée, si, lors de sa préparation, ce corps n'a pas été bien desséché par l'alcool, puis lavé à l'éther. On a alors une matière cornée assez adhérente au filtre et très peu soluble dans l'eau.

Qu'elle soit préparée par la première ou la seconde méthode,

la solution aqueuse de cette substance pulvéruleuse, inoculée à des lapins, s'est montrée toxique à des doses supérieures à 80 milligrammes par kilogramme d'animal. Mais en l'employant, je n'ai pas pu réussir à immuniser, complètement, des animaux contre le charbon.

En faisant la culture dans des ballons Fernbach, j'ai obtenu des cultures plus abondantes. Celles-ci, traitées de la même manière, au bout de 6 jours donnaient une poudre d'aspect extérieur semblable à celui de l'autre substance, mais elle n'était pas toxique.

Dans ce même milieu de culture, j'ai aussi fait pousser à cette température de la bactéridie asporogène préparée par la méthode de M. le Dr E. Roux ¹, rendue très virulente par des passages successifs de lapin à lapin. Les ballons de culture étaientensemencés avec le sang d'un animal que cette bactéridie venait de tuer en une trentaine d'heures. La culture de la variété asporogène se fait également assez bien dans ce milieu et à cette température de 36°. On retire de ces cultures un corps ayant des propriétés semblables à celles de la substance fournie par les cultures du charbon à spores.

A cette température, la culture de la bactéridie, dans ce milieu, donne donc un produit ayant des propriétés toxiques. Cette toxicité n'est toutefois pas bien grande, et les résultats que j'ai obtenus ainsi ne m'ont pas semblé suffisamment nets.

Cultures à 20°. — Les ballons, étant remplis au tiers de leur volume avec la solution de peptone, sont ensemencés de la même façon avec du sang d'un lapin mort du charbon en moins de trente heures. Puis ils sont mis pendant deux jours à l'étuve à 36° pour hâter le début du développement de la culture. Après ce temps, ils sont portés dans une étuve dont la température est voisine de 20°. A cette température, la bactéridie pousse très lentement dans ce milieu, les cultures y sont toujours grêles, d'aspect chétif. Avec la bactéridie asporogène, les cultures y sont encore moins abondantes qu'avec le charbon à spores.

Étant donné ce peu de rapidité du développement, j'abandonnais la culture à elle-même environ quinze jours à cette

¹ E. Roux, Bactéridie charbonneuse asporogène. (*Annales Institut Pasteur*, t. IV, 1890, p. 25.)

température. Puis le liquide de culture filtré était traité pour en extraire la toxine sèche.

Finalement, on retire ainsi une substance amorphe pulvérulente de couleur brun foncé.

Elle renferme encore une petite quantité de sulfate d'ammoniaque, mais les expériences que j'ai faites sur les animaux avec des quantités plus grandes de ce sel m'ont montré que la présence de ce sulfate ne pouvait pas changer les résultats.

Le sulfate d'ammoniaque étant mis à part, cette poudre ne laisse par calcination qu'une quantité de cendres insignifiante, correspondant à moins de 0,2 pour cent.

Ainsi que cela a été fait pour des corps d'origine analogue, et pour ne rien préjuger sur la nature chimique de ce produit, je lui donnerai dans la suite de ce travail le nom de toxine, nom qui est en rapport avec ses propriétés physiologiques comme on le verra ultérieurement.

Cette toxine, bien desséchée par les opérations qui terminent sa préparation, est soluble dans l'eau. Elle est également soluble dans l'eau phéniquée à 1 0/0. Elle est insoluble dans le chloroforme.

La solution aqueuse est neutre aux réactifs colorés.

L'addition de sel marin, puis d'acide acétique, ne produit ni trouble, ni précipité d'aucune sorte dans la solution aqueuse.

L'acide azotique, à froid ou à l'ébullition, étendu ou concentré, ne donne ni précipité ni coloration jaune.

Le ferrocyanure et l'acide acétique ne donnent pas davantage de précipité.

L'acide pyrogallique est également sans action.

La réaction de Piotrowski, ou du biuret, donne une coloration nettement bleue, dès que l'on met dans la solution additionnée de potasse quelques gouttes de la solution très étendue de sulfate de cuivre.

Avec l'acide chlorhydrique concentré et bouillant, on n'a aucune coloration violet bleu.

Mélangée avec une solution de chlorure d'or à 1/1000 et portée à l'ébullition, cette toxine ne donne, par l'addition de quelques gouttes d'acide formique, aucune des colorations rose puis rouge pourpre que donnent les substances albuminoïdes dans ces mêmes conditions.

Au contact du mélange d'un volume d'acide sulfurique concentré et de deux volumes d'acide acétique cristallisable, cette toxine ne donne pas de coloration violette, même si on chauffe. (Réaction d'Adamkiewicz.)

En faisant bouillir la solution de toxine avec le réactif de Millon, on n'a ni précipité rouge, ni coloration rouge du liquide.

L'iodure double de potassium et de mercure, l'iodure ioduré de potassium, l'acide picrique ne donnent pas de précipité.

Par ce qui précède, on voit que, sauf la réaction du biuret qui est identique à celle donnée par les substances albuminoïdes, cette toxine ne donne aucune des réactions considérées comme caractéristiques des propeptones, peptones et matières albuminoïdes.

En outre, l'absence de réaction avec l'iodure double de potassium et de mercure, l'acide picrique, semble indiquer que cette substance ne contient pas non plus d'alcaloïde.

Le chlorure d'or à l'ébullition est en partie réduit par la toxine.

Portée quelque temps à l'ébullition avec du chlorure de platine, la solution reste limpide; mais il se produit par refroidissement un léger précipité. Pour cette réaction, l'ammoniaque avait été soigneusement éliminée de la solution de toxine.

Le mode de préparation de cette substance étant le même que celui employé pour isoler les diastases excrétées par les cellules, j'ai recherché si la toxine avait quelque action diastatique, soit par elle-même, soit par un mélange avec une diastase entraînée avec elle.

On sait que la bactériodie pousse sur l'empois d'amidon en le saccharifiant. Dans ces conditions, il y a production d'amylase par le microbe. Mais ici, le phénomène ne s'arrête pas à la transformation de l'amidon en dextrine et en maltose. La bactériodie continue à se développer aux dépens des matériaux ainsi formés, donnant lieu à une production d'acides. Si la culture se fait dans un empois préalablement additionné de carbonate de chaux, les acides se combinent avec la chaux au fur et à mesure de leur production et on trouve finalement dans le milieu de culture de l'acétate de chaux.

J'ai mis la toxine au contact d'un empois d'amidon à 3 0/0 dans une étuve réglée à 60°. L'amidon n'était pas liquéfié après

plusieurs heures, et cela avec des quantités de toxine qui se sont élevées jusqu'à 50 milligrammes. Il en a été de même aux températures de 50° et de 38°.

Dans ces recherches sur les actions diastasiques de la toxine, je me servais de la substance extraite des cultures sans que celles-ci eussent été filtrées sur porcelaine. D'ailleurs, pour les cultures faites avec la bactériidie asporogène, cette filtration est inutile. Les microbes sont tués par l'addition de chloroforme ou d'essence de moutarde, puis les cultures sont filtrées sur papier.

Cette toxine a été mise aussi, à ces mêmes températures de 38°, 50° et 60°, au contact de solutions de sucre de canne. Trois heures après le début de l'expérience, il n'y avait pas de changement dans la composition du liquide sucré.

La bactériidie pousse également bien dans les milieux glycogénés sans production de glucose, d'après M. Roger¹. Cette absence de glucose ou de sucre dans le milieu de culture tient à la faible quantité de glycogène employée par M. Roger dans ses milieux. On a, en effet, avec le glycogène, des faits analogues à ceux que l'on a avec l'empois d'amidon. Par suite du développement de la bactériidie, au bout de très peu de temps les sucres primitivement formés sont transformés en acides.

A ces mêmes températures de 38°, 50° et 60°, je mets, pendant des temps plus ou moins longs, le mélange des solutions de glycogène et de toxine. A la fin de l'opération, la quantité de glycogène n'avait pas varié.

Je n'ai pas réussi non plus à mettre en évidence, dans le sang des animaux mourant du charbon, quelque propriété saccharifiante sur l'empois d'amidon.

Le sang des animaux charbonneux ne contient pas davantage une substance capable de détruire le glycogène dans les solutions aqueuses de ce corps. Pour le montrer, je mets dans deux vases des volumes égaux d'une même solution de glycogène. Chacun d'eux reçoit ensuite des quantités égales du même sang charbonneux et quelques gouttes d'essence de moutarde. L'un de ces vases, le premier, est porté dans une étuve à 50°, pendant que je dose le glycogène contenu dans le second par le procédé de

1. H. ROGER, Sur les variations de la glycogénie dans l'infection charbonneuse (*Compte rendu Acad. sciences*, 9 octobre 1893, p. 489). — H. ROGER, Recherches sur les variations de la glycogénie dans l'infection charbonneuse (*Archives de physiologie normale et pathologique*, XXVI, 1894, p. 64).

Landwehr¹. Le même procédé de dosage appliqué à la fin de l'expérience au premier récipient donne pour celui-ci des quantités de glycogène sensiblement égales à celles du second.

La disparition plus ou moins complète du glycogène dans le foie des animaux succombant à l'infection charbonneuse ne paraîtrait donc pas tenir à la présence dans leur sang d'une substance capable de transformer le glycogène *in vitro*.

La toxine charbonneuse n'a aucune action liquéfiante sur la gélatine.

En résumé, j'ai obtenu un corps ne présentant aucune des réactions des matières albuminoïdes, peptones, propeptones, alcaloïdes. Ce corps n'exerce aucune action saccharifiante sur l'empois d'amidon et le glycogène. Il est sans action sur les solutions sucrées. Il ne liquéfie pas la gélatine. Par conséquent jusqu'ici nous nous trouvons en présence d'une substance qui ne possède aucune des propriétés chimiques que peuvent présenter les produits microbiens analogues. Mais les animaux auxquels on l'inocule réagissent, et à ce point de vue cette toxine agit comme les corps similaires.

ACTION DE LA TOXINE SUR LES ANIMAUX

Ces expériences ont porté en grande partie sur des lapins. La toxine était dissoute dans de l'eau stérilisée et injectée sous la peau du dos de ces animaux.

Pour une même dose de toxine, les réactions de l'animal n'ont pas toujours la même intensité, certains lapins semblant être, à cet égard, plus résistants que d'autres.

Outre ces différences, dues aux animaux, il en existe d'autres tenant à la provenance de la toxine employée. Un grand nombre d'expériences ont été faites avec de la toxine préparée par la première méthode décrite. De même j'ai préparé de la toxine avec de la bactéridie asporogène et d'autre avec la bactéridie à spores.

De là résultent des différences qui se manifestent surtout dans les doses nécessaires pour amener la mort des animaux et aussi dans la rapidité avec laquelle survient cette mort pour une dose donnée.

1. LANDWEHR, *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, VIII, p. 167.

Mais les phénomènes produits étant semblable avec ces toxines d'espèces différentes, je n'en ferai qu'une seule description. Je signalerai ultérieurement les différences d'activité de ces diverses toxines.

L'inoculation de la toxine est généralement suivie d'une élévation de la température. Cette élévation n'est pas immédiate, elle ne commence guère à se manifester que quatre heures après l'inoculation. Elle est elle-même précédée d'un abaissement qui a atteint quelquefois près d'un degré.

A ce moment, ni la respiration, ni le rythme cardiaque ne semblent altérés.

Même en injectant des quantités de toxine égales à 100 milligrammes par kilogramme d'animal, le sang du lapin reste coagulable. Les prises de sang ont été faites : 20 minutes, 40 minutes, 1 heure, 2 heures, 4 heures après l'inoculation de la toxine. Toujours il s'est formé un caillot et cela dans le temps normal.

Le plus souvent, c'est le lendemain de l'inoculation qu'on a une élévation notable de la température. Cette élévation peut dépasser un degré et demi. La courbe des températures présente alors des oscillations assez grandes qui persistent jusqu'à la mort de l'animal quand celui-ci succombe. La mort se produit avec un abaissement considérable de la température, que j'ai vu tomber jusqu'à 8° au dessous de la température normale de l'animal.

Quand au contraire l'animal se rétablit, à la suite de l'injection d'une dose trop minime de toxine, les oscillations de la courbe des températures vont en s'atténuant peu à peu.

En même temps que ces phénomènes se manifestent du côté de la température, l'animal a ordinairement de la diarrhée. L'amaigrissement ne fait jamais défaut. L'animal se cachectise, et peu à peu, quand il survit une dizaine de jours à l'inoculation de la toxine, il peut arriver à perdre plus d'un tiers de son poids.

Dans les derniers moments, outre le grand abaissement de la température, on observe de la paraplégie. Le lapin semble être insensible à la douleur, du moins pour les membres postérieurs. La cage thoracique est animée de mouvements inspiratoires très notables; il y a en outre par moments des spasmes des membres. Cet état peut, dans quelques cas, se prolonger plus de vingt-quatre heures. Bien que la respiration semble devenir peu à peu moins

pénible, l'animal reste couché sur le flanc et peut à peine se soulever sur ses membres antérieurs. La pupille est dilatée et les paupières ne se ferment plus quand on touche la cornée. Le choc cardiaque devient de moins en moins distinct, le rythme du cœur est altéré. Puis la respiration ne se fait plus qu'à des intervalles de plus en plus éloignés. Des contractions spasmodiques se produisent dans beaucoup de muscles; la tête se renverse en arrière, le tronc se met en opisthotonos, les membres sont en extension, les narines dilatées et le lapin meurt en poussant plusieurs cris aigus.

Ces phénomènes sont ceux que l'on a dans la mort par infection charbonneuse; ils me semblent être identiques à ceux qu'on observe dans la mort par asphyxie.

A l'autopsie, le foie ne paraît pas augmenté de volume, la rate est petite, de couleur normale. La pulpe de rate, de foie, le sang du cœur étalés sur des lamelles et colorés soit au bleu de méthylène, soit par la méthode de Gram ne montrent pas de microbes. Lesensemencements faits avec ces pulpes et ce sang dans du bouillon et sur de la gélose nutritive ne donnent aucune culture.

M. Roger¹ a dosé le glycogène du foie des animaux succombant au charbon. La conclusion de ses recherches est que le glycogène a totalement disparu du foie de ces animaux. En sacrifiant des lapins charbonneux un peu avant la mort et faisant le dosage du glycogène par la méthode de Landwehr², je n'ai pas eu des résultats aussi nets. La quantité de glycogène a été nulle ou à peu près dans plusieurs cas, mais dans d'autres elle a été de 2, 5 et jusqu'à 60 milligrammes dans un cas. Il y a donc ou disparition ou diminution considérable du glycogène dans le foie des animaux charbonneux.

Par ce même procédé de Landwehr, j'ai également dosé, au moment de la mort, le glycogène contenu dans le foie de lapins succombant en moins de six jours à l'inoculation de la toxine. Les quantités trouvées ont été nulles ou à peu près dans quelques cas; dans la majorité des lapins intoxiqués elles ont varié de 10 à 20 milligrammes pour s'élever une fois jusqu'à 75 milligrammes. Bien que ces nombres soient semblables à

1. ROGER, *Loc. cit.*

2. LANDWEHR, *Loc. cit.*

ceux que j'ai trouvés dans les mêmes conditions chez des lapins mourant du charbon, je ne tire, bien entendu, aucune conclusion sur l'identité possible des deux phénomènes. Tant de causes peuvent influencer la fonction glycogénique du foie qu'une telle induction serait peu justifiée.

La quantité de sucre contenue dans le sang, évaluée en suivant la méthode indiquée par Claude Bernard ¹, a varié chez ces animaux intoxiqués de 0^{gr},86 à 1^{gr},8 par litre de sang.

Je n'ai jamais trouvé d'albumine dans les urines.

La mort chez les animaux survient plus ou moins longtemps après l'inoculation de la toxine. Cette survie plus ou moins grande dépend de la quantité de substance inoculée. Malheureusement, des quantités égales n'amènent pas chez tous des phénomènes identiques et cela que l'égalité des doses ait lieu d'une façon absolue ou soit rapportée au kilogramme d'animal. Tous ne réagissent pas de la même façon, et tel animal meurt en 2 jours à la suite de l'inoculation d'une dose de 30 milligrammes, alors que d'autres résistent à des doses de 120 milligrammes ². Mais, étant donné un animal, on peut toujours arriver à trouver une dose de toxine pour le tuer et cette dose n'a jamais dépassé 200 milligrammes de toxine, première méthode, dans les expériences que j'ai faites. On a là, chez les lapins, pour la toxine, des différences de sensibilité, suivant les individus, analogues à celles que l'on a pour le microbe qui sécrète cette substance.

Comme exemple des réactions du côté de la température et du poids, je citerai d'abord l'expérience suivante où l'animal a survécu 19 jours à l'inoculation de la toxine.

Expérience I. — Lapin de 1,810 grammes. Température 39°2, on lui inocule sous la peau 45 milligrammes de toxine, soit 25 milligrammes par kilogramme.

1 ^{er} jour...	}	4 heure après l'inoculation.....	39° 1
		2 — — — — —	38° 9
		3 — — — — —	39° 1
		4 — — — — —	39° 4
		5 — — — — —	39° 6
		6 — — — — —	39° 5
		7 — — — — —	39° 8
		8 — — — — —	39° 9

1. CLAUDE BERNARD, *Leçons sur le diabète et la glycogénie animale*. Paris, J.-B. Baillière, 1877, p. 198 à 205.

2. Voir plus loin, tableau II, page 24.

2 ^e jour...	{	21 heures après l'inoculation.....	41° 1	
		24 —	—	40° 5
		27 —	—	(diarrhée)... 40° 1
		30 —	—	 40° 8
3 ^e jour		matin 41° 6	soir 40° 2	poids 1,600
4 ^e jour		matin 38° 4	soir 40° 1	
5 ^e jour		matin 39° 8	soir 39°	poids 1,450
6 ^e jour		matin 39° 9		
7 ^e jour		matin 40° 3	soir 40° 2	poids 1,500
8 ^e jour		matin 39° 2	soir 40° 1	
9 ^e jour		matin 41° 2	soir 40° 3	
10 ^e jour		matin 40° 6	soir 39° 5	poids 1,440
11 ^e jour		matin 39° 7	soir 40° 2	
12 ^e jour		matin 39° 6	soir 40° 9	poids 1,300
13 ^e jour		matin 39° 9	soir 39° 2	
14 ^e jour		matin 39° 7	soir 40°	
15 ^e jour		matin 41° 6	soir 41° 1	poids 1,360
16 ^e jour		matin 40°	soir 41° 2	
17 ^e jour		matin 40° 9	soir 39° 7	poids 1,190
18 ^e jour		matin 39° 1	3 h. 37° 2	
			5 h. 34° 1	
19 ^e jour		matin 31° 9		poids 1,000

Le lapin meurt ce 19^e jour.

L'autopsie montre une rate petite, de couleur normale. Le foie n'est pas augmenté de volume. Il n'y a pas d'épanchement dans la plèvre ni dans le péricarde. Le sang du cœur, étendu sur des lamelles, ne montre pas de microbe ni par les colorations ni par lesensemencements.

— Dans l'expérience suivante, la mort est survenue en quatre jours; la température n'a été élevée que le lendemain de l'inoculation.

Expérience II. — Lapin de 1,620 grammes, la température avant l'inoculation est de 39° 9.

On lui injecte sous la peau du dos 100 milligrammes de toxine, soit 61 milligrammes par kilogramme.

1 ^{er} jour...	{	1 heure après l'inoculation.....	39° 8	
		3 —	—	39° 7
		5 —	—	40°
		9 —	—	40° 1
2 ^e jour....	{	24 —	—	40° 5
		32 —	—	40° 2
3 ^e jour.		matin 39° 7	soir 39° 8	poids 1,440
4 ^e jour.		matin 35° 4		

Ce lapin meurt le 4^e jour après l'inoculation. Au moment de la mort, le foie est plongé dans l'eau bouillante, légèrement alcaline, pour chercher la quantité de glycogène qu'il peut contenir. Je trouve un poids de glycogène égal à 27 milligrammes dans le foie de ce lapin.

L'estomac était encore rempli d'aliments.

La rate était petite, de couleur normale, et les tubes de gélose et de bouillon, ensemencés avec la pulpe de cette rate, sont restés stériles.

La vessie était remplie d'urine. Cette urine ne contenait ni sucre ni albumine.

Je citerai enfin l'expérience suivante où l'animal a résisté à l'inoculation d'une première dose de toxine.

Expérience III. — Lapin de 1,920 grammes; température initiale 39° 6. Ce lapin reçoit 96 milligrammes de toxine, soit 50 milligrammes par kilogramme.

1 ^{er} jour.....	{	15 heures après l'inoculation.....	40° 4
		18 — — —	40° 1
		24 — — —	40°
2 ^e jour		matin 39° 6	soir 39° 7
3 ^e jour		matin 39° 9	soir 39° 8
			poids 1,920
4 ^e jour		matin 40° 1	soir 40° 3
5 ^e jour		matin 39° 8	soir 40° 5
			poids 1,815
6 ^e jour		matin 39° 6	
7 ^e jour		matin 40° 2	soir 40°
			poids 1,765
8 ^e jour		matin 40° 1	soir 39° 9
9 ^e jour		matin 39° 8	soir 40° 1
			poids 1,690
10 ^e jour		matin 39° 6	soir 39° 9
11 ^e jour		matin 39° 7	
			poids 1,780
12 ^e jour		matin 39° 6	
13 ^e jour		matin 39° 5	
			poids 1,870

Les jours suivants, la température continue à rester stationnaire et le poids à augmenter graduellement.

Lorsque l'animal a résisté à l'inoculation d'une première dose de toxine, l'inoculation d'une nouvelle dose produit des phénomènes de même ordre que ceux produits par la première. Leur intensité dépend de la quantité de toxine donnée cette seconde fois, elle dépend aussi du temps écoulé entre les deux inoculations. Voici par exemple la suite de l'expérience précédente :

Expérience III (suite). — Deux mois après l'inoculation de la première dose de toxine, le lapin reçoit une nouvelle dose égale à la première.

Avant l'inoculation, sa température était de 39° 7, son poids était de 2,410 grammes.

1 ^{er} jour.....	{ 6 heures après l'inoculation 40° 2		
	{ 32 — — — 40°		poids 2,410
2 ^e jour	matin 40° 5	soir 40° 3	
3 ^e jour	matin 40° 4	soir 40° 7	poids 2,030
4 ^e jour	matin 40° 5	soir 39° 7	
5 ^e jour	matin 40° 4	soir 40°	poids 1,970
6 ^e jour	matin 40° 1	soir 39° 5	
7 ^e jour	matin 39° 8	soir 40° 1	poids 1,940
8 ^e jour	matin 39° 9		
9 ^e jour	matin 39° 7		poids 2,410
10 ^e jour	matin 39° 8		poids 2,490

Le lapin continue à se rétablir les jours suivants.

Dans l'expérience précédente où il s'est écoulé un temps assez long entre les deux inoculations, les réactions de l'animal ont été très marquées surtout du côté du poids, ce lapin ayant perdu près de $1/5$ de son poids.

On a de même des élévations de température et des pertes de poids analogues à celles de l'expérience précédente en donnant une nouvelle dose de toxine de beaucoup supérieure à la première, dès que l'animal est rétabli des suites de l'inoculation antérieure.

Tel est le cas de l'expérience :

Expérience IV. — Lapin de 1,970 grammes, température 39°,3. Inoculé avec 7^{me},9 de toxine, soit 4 milligrammes par kilogramme.

	{ 6 heures après l'inoculation 40°		
	{ 8 — — — 40° 4		
1 ^{er} jour	matin 40° 9	soir 40° 4	
2 ^e jour	matin 40°	soir 39° 7	poids 1,750
3 ^e jour	matin 40° 2	soir 39° 9	
4 ^e jour	matin 39° 9	soir 39° 4	poids 1,710
5 ^e jour	matin 40° 7	soir 39° 9	
6 ^e jour	matin 39° 6	soir 40°	poids 1,690
7 ^e jour	matin 39° 5	soir 39° 3	
8 ^e jour	matin 39° 4		poids 1,820

Le soir de ce 8^e jour, le lapin est inoculé de nouveau avec 30 milligrammes de la même toxine, soit 16 milligrammes par kilogramme.

9 ^e jour	matin 40° 5	soir 40° 7	
10 ^e jour	matin 41° 1	soir 40° 2	
11 ^e jour	matin 40° 5	soir 39° 5	poids 1,640
12 ^e jour	matin 40° 7	soir 39° 2	

13 ^e jour	matin 40°	soir 39° 3	poids 1,530
14 ^e jour	matin 39° 9	soir 39° 1	
15 ^e jour	matin 38° 6		poids 1,360

Le lapin meurt le 15^e jour en présentant les symptômes décrits précédemment. Les milieux nutritifs ensemencés avec le sang, la pulpe de rate ne donnent pas de cultures. Le foie ne contenait pas de glycogène.

— Si le temps écoulé entre le moment où l'animal commence à se rétablir et la seconde inoculation n'est pas trop considérable, si de plus la seconde dose de toxine n'est pas beaucoup supérieure à la première, les réactions sont moindres. D'après mes expériences, pour être à peu près certain que le lapin résistera à une seconde inoculation, il faut réunir plusieurs conditions : si l'animal a eu de la diarrhée, celle-ci doit avoir cessé depuis deux jours ; le poids de l'animal doit être dans une période d'augmentation et pas trop inférieur à celui du début de l'expérience ; la température doit être revenue à la température normale et la nouvelle dose de toxine ne doit pas dépasser les 5/3 de la première quantité inoculée.

C'est ce qui s'est passé dans l'expérience :

Expérience V. — Lapin 1,880 grammes, température 39° 9. Reçoit 3^{mg}, 7 de toxine. Soit 2 milligrammes par kilog.

1 ^{er} jour.....	{ 16 heures après l'inoculation 39° 5		
	{ 24 — — 39° 9		
2 ^e jour	matin 40° 2	soir 40° 1	poids 1,750
3 ^e jour	matin 40° 1	soir 39° 8	
4 ^e jour	matin 39° 8	soir 39° 9	poids 1,770
5 ^e jour	matin 39° 9		
6 ^e jour	matin 40°		poids 1,840
Le 6 ^e jour inoculé 6 milligrammes de toxine.			
7 ^e jour	matin 39° 8	soir 40° 3	
8 ^e jour	matin 40°	soir 40° 4	poids 1,690
9 ^e jour	matin 39° 9	soir 40° 3	
10 ^e jour	matin 40° 1	soir 39° 8	poids 1,630
11 ^e jour	matin 39° 9	soir 40°	
12 ^e jour	matin 39° 8		poids 1,780
13 ^e jour	matin 39° 9		poids 1,850

L'inoculation de 10 milligrammes de toxine, le quatorzième jour, est suivie d'une élévation de température de 5 dixièmes de degré, le poids descend de nouveau à 1,750 grammes le seizième jour et remonte à 1,840 grammes le 18^e jour.

Le vingtième jour, ce même lapin reçoit 20 milligrammes de toxine. Cette

inoculation élève la température de 9 dixièmes de degré, le poids tombe à 1,600 grammes le 25^e jour, pour remonter à 1,660 grammes le 27^e jour et à 1,820 grammes le 30^e jour.

Le trente et unième jour, l'inoculation de 30 milligrammes de toxine donne le lendemain une température de 40°,3; le 33^e jour, le lapin pèse 1,780, et le 35^e jour son poids est de 1,870 grammes.

On voit ainsi que les animaux peuvent acquérir pour la toxine, donnée à des intervalles de temps suffisamment éloignés, une certaine accoutumance. Celle-ci disparaît d'ailleurs peu à peu. Les expériences que j'ai faites à ce sujet ne sont pas assez concluantes pour que je puisse indiquer d'une façon précise le temps pendant lequel elle persiste. Mais, toutefois, il m'a semblé que chez des lapins amenés peu à peu à recevoir 60 milligrammes de toxine par kilog., cette accoutumance avait disparu ou au moins était très atténuée cinq à six semaines après l'inoculation de la dernière dose de toxine.

J'ai dit plus haut que, étant donné un animal qui a résisté à une première inoculation de toxine, on peut toujours trouver une dose suffisante pour le tuer. D'après ce qui précède, il est nécessaire, pour éviter d'employer à cet effet une dose trop grande, d'attendre un temps assez long entre les deux inoculations.

Une quantité minime de toxine, 1 milligramme par exemple ou encore 2 milligrammes comme dans l'expérience V, n'amène pas de grandes variations dans la température, ni des pertes de poids bien considérables. Mais, en répétant quotidiennement l'inoculation de cette faible dose, on arrive à obtenir des réactions plus considérable, analogues à celles données par des quantités plus élevées de toxine. Dans le cas de ces inoculations quotidiennes d'une dose faiblement active, il y a, non accoutumance, mais, en quelque sorte, superposition des effets.

Enfin, l'inoculation quotidienne de doses inférieures à 1/2 milligrammes ne produit presque aucune réaction de la part de l'animal.

COMPARAISON DES ACTIVITÉS DE DIFFÉRENTES TOXINES PRÉPARÉES DANS CE MILIEU

Ainsi que je l'ai déjà dit, l'activité de la toxine retirée d'une culture de charbon n'est pas fixe. Elle dépend probablement d'un grand nombre de facteurs tels que : la température, la virulence

du bacille employé pour la culture, la composition du milieu de culture, etc.

Le mode opératoire que j'ai indiqué sous le titre de deuxième procédé est celui qui m'a donné à la fois, pour un certain volume d'un milieu de culture à 4 0/0 de peptone, le plus grand poids de toxine (déduction faite du poids des cendres et du sulfate d'ammoniaque) et en même temps la toxine la plus active. De plus, les résultats de l'inoculation aux animaux de la substance ainsi préparée m'ont semblé plus constants.

En suivant le premier procédé, on retire des cultures de charbon une toxine produisant bien sur les animaux les phénomènes décrits. Mais, le degré d'activité du produit ainsi obtenu est notablement inférieur à celui de la toxine préparée en employant la seconde méthode.

Pour montrer les différences résultant de ce chef et aussi du fait de la variété de la bactériodie employée, je résumerai mes expériences dans les trois tableaux suivants.

Les diverses toxines employées ont toutes été préparées en ensemençant dans les milieux de culture du charbon virulent¹, et les cultures ont été faites dans les conditions de température indiquées. Il ne s'agit ici que des cultures à 20°.

Le poids de la toxine inscrit dans ces tableaux est celui obtenu en déduisant du poids brut inoculé le poids des cendres et le poids de sulfate d'ammoniaque contenus dans la quantité de l'échantillon de toxine employé.

Toutes les expériences auxquelles se rapportent les chiffres de ces tableaux ont été faites sur des lapins.

Les animaux qui ont résisté à la dose de toxine inoculée sont marqués d'un astérisque.

¹ Voir page 7.

TABLEAU I

Milieu de culture et toxine préparés suivant le premier procédé.

Milieuensemencé avec du charbon à spores.

DOSE PAR KILOG. en milligr.	DOSE TOTALE en milligr.	DURÉE DE LA SURVIE
25	45	49 jours. (Expérience I.)
*30	47	résiste.
30	50	40 jours et demi.
*30	55	résiste.
40	54	4 jour et demi.
*40	55	résiste.
*40	67	résiste.
*40	68	résiste.
*40	72	résiste.
40	77	45 jours et demi.
50	85	42 jours et demi.
*50	96	résiste. (Expérience III.)
*70	97	résiste.
*70	108	résiste.
70	123	7 jours.
70	134	10 jours.
*80	114	résiste.
80	127	3 jours.
80	136	44 jours.
80	149	2 jours et demi.
80	152	4 jours et demi.
Les lapins qui ont été inoculés avec des doses inférieures à 25 milligrammes par kilogramme ont résisté.		

TABLEAU II

Milieu de culture et toxine préparés suivant le premier procédé.

Milieuensemencé avec du charbon asporogène.

DOSE PAR KILOG. en milligr.	DOSE TOTALE en milligr.	DURÉE DE LA SURVIE
20	30	2 jours.
*20	32	résiste.
20	33	16 jours et demi.
*20	36	résiste.
20	37	10 jours et demi.
*24	50	résiste.
*30	42	résiste.
30	49	4 jours.
*30	51	résiste.
30	58	9 jours.
40	54	5 jours et demi.
*40	69	résiste.
40	71	3 jours et demi.
50	72	3 jours.
*50	74	résiste.
50	90	5 jours.
*60	97	résiste.
60	104	11 jours et demi.
60	107	7 jours.
60	109	4 jours.
61	100	4 jours. (Expérience II.)
70	109	7 jours.
*70	123	résiste.
70	134	10 jours.
70	135	2 jours et demi.

Les animaux ont résisté à des doses inférieures à 20 milligrammes par kilogramme.

TABLEAU III

Milieu de culture et toxine préparés suivant le deuxième procédé.

Milieuensemencé avec de la bactériidie asporogène.

DOSE PAR KILOG. en milligr.	DOSE TOTALE en milligr.	DURÉE DE LA SURVIE
*3	5,1	résiste.
3	5,3	4 jours et demi.
3	5,7	12 jours.
3	5,9	6 jours.
3,8	5,5	10 jours.
4	6	1 jour et demi.
4	6,6	11 jours.
4	6,9	2 jours et demi.
4	7,3	3 jours.
*4	7,9	résiste. (Expérience IV.)
8	12	4 jours.
*8	15,4	résiste.
10	18,4	5 jours.
20	33,8	18 heures.
20	36,2	5 jours et demi.
30	43,2	22 heures.
40	84	24 heures.
Les lapins qui ont été inoculés avec des doses inférieures à 3 milli-grammes par kilogramme ont résisté.		

La comparaison des tableaux I et II montre que le même milieu de peptone donne à 20° une toxine un peu plus active quand on l'aensemencé avec de la bactériidie asporogène, au lieu de la bactériidie à spores.

Il résulte des tableaux II et III que la toxine provenant des cultures de la bactériidie asporogène est beaucoup plus active, si l'on emploie le second procédé pour la préparation du milieu de culture et de la toxine.

J'ai déjà indiqué les différences d'activité semblant provenir de la température à laquelle se fait la culture de la bactériidie. La substance préparée à l'étuve à 36° est beaucoup moins active que celle préparée à basse température.

Un autre agent, intervenant sur la production de la toxine dans ce milieu, est l'air. La bactériidie se développe abondamment dans un milieu bien aéré. Si, faisant la culture en présence d'une grande quantité d'air dans un ballon Fernbach, on renouvelle fréquemment cet air, on obtient ainsi une plus belle récolte. Mais, le milieu, traité comme il a été dit pour la préparation de la toxine, donne une substance de très faible activité. Il est en effet nécessaire de dépasser des doses de 100 milligrammes par kilogramme (première méthode) pour tuer le lapin avec le produit de ces cultures ainsi aérées.

TOXINE NON DISSOUTE DANS L'EAU

Au lieu d'inoculer aux animaux la toxine préalablement dissoute dans l'eau, on peut la leur donner à l'état solide de la façon suivante : Prenant une quantité déterminée de toxine finement pulvérisée, je l'agite avec de l'huile stérilisée de manière à la répartir à peu près également dans tout le liquide. Ce mélange est ensuite inoculé à un lapin sous la peau du ventre.

En faisant ainsi l'expérience, on remarque que l'activité de la substance semble être considérablement diminuée. J'ai ainsi pu donner à trois lapins, 31,42 et 44 milligrammes par kilogramme de la toxine du tableau III, ce qui faisait pour chacun une dose totale de 60 milligrammes, sans obtenir de la part de l'animal de réaction bien nette. La plus grande diminution de poids que j'aie constatée dans ce cas a été de 80 grammes.

Dans ces conditions, la toxine n'est absorbée que lentement; chez le premier de ces animaux, sacrifié dix jours après l'inoculation, j'ai encore retrouvé sous la peau des grains de toxine. Il en a été de même pour le second qui est mort en deux jours et demi d'une inoculation de charbon faite quinze jours après l'inoculation de la toxine. L'expérience est probablement comparable à celle que l'on fait en inoculant chaque jour de très petites quantités de toxine.

On obtient encore des résultats analogues, en enfermant la

toxine dans un sac clos de collodion. Le sac est ensuite placé sous la peau du dos d'un lapin. On peut ainsi mettre dans ces sacs des quantités très grandes de toxine sans que l'animal s'en montre beaucoup incommodé. De cette façon, la toxine diffuse lentement et d'une manière continue à travers la membrane dialysante formée par la couche de collodion. On a ici évidemment le même effet que donnerait l'inoculation répétée de très petites doses de toxine.

Voici une de ces expériences :

Expériences VI. — Sous la peau du dos d'un lapin de 2,180 grammes, j'insère un sac de collodion contenant 600 milligrammes de toxine.

(1^{er} procédé, tableau II.)

Les poids de ce lapin ont été successivement, les jours suivants :

1 ^{er} jour	2,160	2,190	2,110	2,100	2,080
6 ^e jour	2,030	2,030	2,100	2,140	2,220
11 ^e jour	2,170	2,280	2,280	2,320	2,340
16 ^e jour	2,450				

Les poids ont continué les jours suivants à croître peu à peu.

ACTION DE LA TOXINE SUR DIVERS ANIMAUX

Cobayes. — Les cobayes, animaux plus sensibles au charbon que les lapins, paraissent cependant plus résistants à la substance que j'ai extraite des cultures. Pour tuer le cobaye, j'ai été obligé d'employer de fortes doses qui, dans certains cas, se sont élevées à 100 milligrammes par kilogramme d'animal. Tous les cobayes, auxquels j'ai inoculé une quantité de toxine inférieure à 30 milligrammes par kilogramme de cobaye, ont résisté.

Rats. — J'ai employé des rats blancs, jeunes et adultes, et des rats d'égout, également des jeunes et des adultes. Un certain nombre d'animaux de chaque sorte a été inoculé avec du charbon virulent; tous les rats ainsi traités sont morts du charbon dans des temps qui ont varié entre 40 heures et 18 jours.

Les autres rats requrent diverses doses de toxine, et il m'a semblé y avoir une certaine analogie entre la sensibilité de ces animaux à la toxine et leur sensibilité à la maladie microbienne.

Pour les petits rats blancs, il suffit de 0,8 à 1 milligramme de toxine pour les tuer, ce qui donne une dose mortelle de 10 milligrammes environ par kilogramme de rat.

Les rats blancs adultes sont beaucoup plus résistants : je ne les ai tués qu'en employant des doses de 20 et même de 40 milligrammes par kilogramme d'animal. Ainsi un rat blanc de 347 grammes est mort 41 jours après l'inoculation de 14 milligrammes de toxine. Le poids du cadavre n'était plus que de 157 grammes.

Les petits rats d'égout sont, le plus souvent, sensibles à 2 milligrammes de toxine, ce qui représente à peu près une dose de 25 milligrammes par kilogramme.

Mais, pour les rats d'égout adultes, il est nécessaire d'atteindre des doses de 30 milligrammes par kilogramme. J'en ai même eu qui n'ont été tués que par des doses de 60 milligrammes.

Chez aucun de ces animaux, je n'ai observé de phénomène de paralysie ou d'incoordination des mouvements suivant immédiatement l'inoculation de la toxine. La mort survient au bout d'un temps plus ou moins long suivant les doses et les individus, mais il n'y avait pas d'effet rapide et pour ainsi dire instantané sur ces animaux.

Souris. — La souris est très sensible à la toxine ; elle meurt à la suite de l'inoculation de doses de $\frac{4}{40}$ à $\frac{5}{40}$ de milligramme.

Pigeons. — Pour tuer les pigeons, il est nécessaire de se servir de quantités assez considérables de toxine. Ceci est parallèle à la résistance de ces animaux à la maladie microbienne.

Ces oiseaux résistent généralement aux doses inférieures à 150 milligrammes par kilogramme. De même que les autres animaux dont j'ai déjà parlé, ils maigrissent beaucoup après l'inoculation, et peuvent ainsi perdre plus de la moitié de leur poids.

Poules. — On sait que les poules sont réfractaires au charbon.

La toxine a une action semblable, car, même en grande quantité, elle a peu d'action sur les poules. Le cas où j'ai obtenu les plus grandes réactions a été le suivant :

Expérience VII. — Poule de 1,470 grammes.

Reçoit 300 milligrammes de toxine ; son poids pris tous les deux jours a été successivement.

2 ^e jour	1,430	1,420	1,310	1,380
10 ^e jour	1,240	1,240	1,190	1,230
18 ^e jour	1,150	1,080	1,100	1,020
26 ^e jour	930	950	1,010	1,060
34 ^e jour	1,130	1,120	1,200	etc.

Grenouilles. Poissons. Écrevisses. — Les grenouilles, les perches, les goujons et les écrevisses sont réfractaires à la toxine comme à la maladie microbienne. J'ai inoculé dans le sac lymphatique dorsal des grenouilles, dans le péritoine des perches et des goujons, dans la cavité du corps des écrevisses, de très grandes quantités de toxine sans qu'aucun de ces animaux ait semblé en être incommodé.

Lapins immunisés. — Les lapins immunisés contre le charbon au moyen de virus atténués paraissent être plus résistants à la toxine que les lapins neufs.

INFLUENCE DE DIVERS AGENTS PHYSIQUES OU CHIMIQUES SUR LA TOXINE DISSOUTE DANS L'EAU

Les travaux faits par divers expérimentateurs sur des produits bactériens similaires ont appris combien sont fragiles la plupart de ces corps. Leur toxicité, le seul caractère que nous possédions jusqu'à présent pour les définir, est souvent détruite ou amoindrie par la lumière, la chaleur, etc. Aussi était-il indiqué de rechercher quelle pouvait être l'influence de ces mêmes agents sur la substance que j'ai préparée.

Action de la chaleur. — La toxine de la bactérie charbonneuse supporte un chauffage à 100° pendant une heure, ou encore un chauffage à 110° pendant quinze minutes et même un chauffage de 120° pendant cinq minutes sans perdre complètement ses propriétés nocives. Inoculée à des lapins après avoir été ainsi chauffée, elle produit chez ces animaux des réactions analogues à celles que cause la toxine non chauffée. La diminution de poids des animaux inoculés est encore ici un phénomène constant. Cette diminution peut également devenir très grande. Dans la majorité des cas, la température subit aussi des variations. La mort arrive accompagnée des symptômes précédemment décrits. Enfin, que la toxine soit chauffée ou non, elle produit sur les animaux des phénomènes analogues, mais non identiques, en ce sens que les doses nécessaires pour les produire avec la même intensité sont différentes avant et après le chauffage.

Expérience VIII. — Lapin 1,920 grammes, température 39°,7. Il est inoculé avec 134 milligrammes, c'est-à-dire 70 milligrammes par kilogramme de toxine chauffée à l'autoclave à 120° pendant 5 minutes.

1 ^{er} jour	matin 40° 2	soir 40° 4	
2 ^e jour	matin 40°	soir 40° 5	poids 1,750
3 ^e jour	matin 40° 1	soir 39° 9	
4 ^e jour	matin 40° 3	soir 40° 4	poids 1,610
5 ^e jour	matin 40°	soir 39° 7	
6 ^e jour	matin 40° 2	soir 40° 2	poids 1,680
7 ^e jour	matin 40° 1		
8 ^e jour	matin 40°	soir 40° 3	poids 1,560
9 ^e jour	matin 39° 6	soir 40° 1	
10 ^e jour	matin 39° 4	soir 39° 7	poids 1,430
11 ^e jour	matin 39° 4	soir 40° 3	
12 ^e jour	matin 38° 2		poids 1,143

Meurt le 12^e jour vers midi.

Il n'y a pas de microbes dans le sang. Lesensemencements faits avec du sang, de la pulpe de foie et de rate dans du bouillon et sur gélose n'ont pas donné de cultures.

De même qu'avec la toxine non chauffée, les animaux qui résistent à une première inoculation de toxine chauffée présentent des réactions moindres lors d'une deuxième inoculation, à condition que celle-ci soit faite dans les conditions que j'ai indiquées précédemment. Par le même procédé, on peut obtenir l'accoutumance à la toxine, chauffée ou non.

Toutefois, si les phénomènes produits sont de même nature, il ne m'a pas semblé que le chauffage n'ait aucunement modifié la toxine. Voici un tableau d'expériences faites avec la même toxine qui a servi pour les expériences du tableau II.

TABLEAU II *bis*.

Même toxine que celle du tableau II, mais chauffée préalablement pendant 15 minutes à l'autoclave à 110° avant d'être inoculée aux lapins.

DOSE PAR KILOG. en milligr.	DOSE TOTALE en milligr.	DURÉE DE LA SURVIE
29	50	4 jours.
*30	49	résiste.
*30	54	résiste.
30	55	1 jour et demi.
40	52	1 jour.
40	68	8 jours.
50	76	11 jours et demi.
50	94	3 jours.
*60	97	résiste.
60	106	1 jour.
60	114	3 jours et demi.
*70	102	résiste.
*80	149	résiste.
*80	154	résiste.
*90	158	résiste.
100	167	12 jours.
110	204	17 jours et demi.

Par la comparaison des tableaux II et II *bis*, on constate une diminution de l'activité de la toxine à la suite du chauffage. Tous les lapins inoculés avec une dose de cette toxine chauffée inférieure à 50 milligrammes, c'est-à-dire à 29 milligrammes, par kilogramme d'animal, ont résisté. Au contraire, il y a eu des lapins qui sont morts à la suite d'une inoculation de moins de 50 milligrammes de toxine non chauffée. Sur 8 lapins qui ont reçu plus de 100 milligrammes de toxine non chauffée, un seul a résisté

(tableau II), tandis que 4 lapins sur 8 ont survécu à une dose supérieure à 100 milligrammes de toxine chauffée.

Ainsi, la toxine charbonneuse, bien qu'affaiblie par la chaleur, n'est pas complètement détruite par cet agent. Sous ce rapport, elle est intermédiaire entre les toxines telles que le venin des serpents, la toxine diphtérique, la toxine tétanique, qui sont complètement détruites par la chaleur et celles qui ne sont pas altérées par le chauffage, tuberculine, toxine cholérique.

D'après ce que l'on sait sur les toxines d'autres microbes et sur les venins des serpents, ces substances perdent toute action nocive par l'action de la lumière au contact de l'air.

Certains corps tels que les hypochlorites alcalins, certains chlorures ont pour effet de diminuer beaucoup l'action des autres toxines connues et des venins. Il était naturel de chercher également quelle pouvait être l'action de ces divers corps sur la toxine charbonneuse.

Action du chlorure de chaux. — Ayant fait avec du chlorure de chaux une solution à 1/12, je l'étendais au moment de m'en servir de quatre fois son volume d'eau. La liqueur obtenue avait alors le titre de 0^l,846 de chlore pour 1,000 c. c.

D'après le tableau III, la dose de 50 milligrammes peut être considérée pour le lapin comme une dose mortelle. Mais il n'en est plus de même si, quinze minutes avant l'inoculation, on mélange cette dose à 2 c. c. de la solution de chlorure de chaux à 1/60. Cette expérience n'a été faite que sur 4 lapins, mais aucun d'eux n'est mort. Toutefois, il y a, dans les 8 jours qui suivent l'inoculation, une baisse de poids qui, pour l'un d'eux, a atteint 150 grammes.

Voici une de ces expériences :

Expérience IX. — Lapin de 1,880 grammes.

Reçoit 50 milligrammes de toxine, mélangés 15 minutes auparavant à 2 c. c. d'une solution de chlorure de chaux à 1/60.

L'inoculation est douloureuse.

Les poids ont été successivement les jours suivants :

1 ^{er} jour	1,900	1,830	1,790	1,800	1,730
6 ^e jour	1,780	1,770	1,830	1,800	1,880
11 ^e jour	1,930				

Les poids ont continué à augmenter peu à peu.

Action des hypochlorites de soude et de potasse. — Une solution d'hypochlorite du commerce était étendue de deux fois son volume d'eau, donnant ainsi une liqueur contenant 4 à 5 litres de chlore pour 1,000 c. c. Je mélangeais 2 c. c. de cette solution étendue à une dose mortelle de toxine. Après un quart d'heure de contact *in vitro*, le tout était inoculé à un lapin. Cette injection est extrêmement douloureuse pour l'animal. Les jours suivants on a une diminution de poids. Le maximum que j'ai eu a été de 80 grammes.

Action du chlorure d'or. — Le chlorure d'or à 1/100 diminue également l'activité de la toxine.

Ainsi, en mélangeant une dose de toxine égale à 50 milligrammes avec 1 c. c. d'une solution de chlorure d'or à 1/100 on peut injecter au bout d'une demi-heure le mélange à un lapin sans que celui-ci meure.

Je citerai l'expérience :

Expérience X. — Lapin de 1,680 grammes.

Reçoit 50 milligrammes de toxine, mélangés 30 minutes avant l'inoculation à 1 c. c. d'une solution de chlorure d'or à 1/100.

Les poids de ce lapin ont été successivement :

1 ^{er} jour	1,750	1,700	1,590	1,680	1,610
6 ^e jour	1,610	1,570	1,610	1,730	1,700
11 ^e jour	1,810	1,780	1,860	etc.	

Action du chlorure de platine. — Le chlorure de platine agit sur la toxine moins rapidement que les corps précédents. Mais, si on le mélange avec une dose mortelle de toxine, 3 à 5 heures avant l'inoculation, l'activité de la toxine est beaucoup diminuée et les animaux résistent en général à l'inoculation. Je n'ai perdu qu'un seul lapin sur les six traités de cette façon.

Voici par exemple :

Expérience XI. — Lapin de 1,540 grammes.

50 milligrammes de toxine sont mélangés à 1 c. c. d'une solution de chlorure de platine à 1/100. 5 heures après le mélange, le tout est inoculé au lapin dont les poids ont été les jours suivants :

1 ^{er} jour	1,530	1,510	1,460	1,510	1,470
6 ^e jour	1,480	1,410	1,520	1,575	1,510
11 ^e jour	1,560	1,665	1,640	1,680	

Action de la solution de Gram. — La solution de Gram a une action analogue à celle des corps précédents, mais beaucoup

moins marquée. Généralement, en mélangeant une dose mortelle de toxine à 3 c. c. d'une solution de Gram un quart heure avant de l'inoculer à un lapin, celui-ci résiste; néanmoins l'animal maigrit beaucoup.

Par conséquent les hypochlorites alcalins, le chlorure d'or, le chlorure de platine et la solution de Gram produisent sur la toxine charbonneuse les mêmes effets que sur les toxines tétanique et diphtérique et sur le venin des serpents. Il y a sous ce rapport la plus grande analogie entre ces divers poisons.

ESSAIS D'IMMUNISATION

D'après ce qu'on a vu, la substance retirée des cultures de charbon dans le milieu de peptone a des propriétés toxiques manifestes. Les différentes espèces animales ont une sensibilité à cette toxine à peu près en rapport avec leur sensibilité particulière à la maladie. De même que d'autres toxines, ce produit est influencé par la chaleur, par les hypochlorites alcalins, montrant ainsi une certaine analogie avec ces autres produits microbiens. Or, on sait qu'en général les toxines données d'une façon croissante et avec ménagement peuvent donner aux animaux sensibles à la maladie une immunité passagère. De plus, la toxine charbonneuse préparée par MM. Hankin et Westbrook leur avait donné, dans certaines conditions, une immunisation immédiate des animaux sur lesquels ils avaient expérimenté, fait qui rapprochait le mode d'action de leur toxine de celui des antitoxines.

J'ai donc cherché si la substance que j'avais préparée avait quelque propriété immunisante contre le charbon et de quelle façon il était possible de mettre ce caractère en évidence. Les expériences que j'ai faites à ce sujet ont porté sur des lapins, des souris et des rats blancs.

J'ai indiqué précédemment comment on pouvait accoutumer peu à peu des lapins à recevoir des doses de toxine, qui primitivement auraient pu être mortelles pour ces animaux. Après avoir choisi des lapins bien portants, je leur donnais une première fois une dose de toxine très faible. Ces lapins étaient pesés très souvent. Dès qu'ils semblaient rétablis de leur première inoculation, une quantité plus considérable de toxine leur était donnée. Puis, ces animaux recevaient une troisième dose quand les effets produits par la seconde avaient cessé. Bref, ils

étaient traités de la façon que j'ai indiquée plus haut à propos de l'expérience V.

Dans la moitié des cas, une dizaine de jours après l'inoculation de 15 milligrammes de toxine ainsi que le montre l'expérience suivante, on peut inoculer au lapin du charbon virulent sans que l'animal succombe à la maladie. Voici l'expérience :

Expérience XII. — Les quantités de toxine inoculées à chaque lapin sont indiquées en milligrammes dans la colonne « inoculations », la seconde de celles affectées à chaque animal.

JOURS	1 ^{er} LAPIN		2 ^e LAPIN		3 ^e LAPIN		4 ^e LAPIN		5 ^e LAPIN		6 ^e LAPIN	
	POIDS	Inoculations	POIDS	Inoculations	POIDS	Inoculations	POIDS	Inoculations	POIDS	Inoculations	POIDS	Inoculations
1	1870	3	1420	3	1500	3	1510	3	1540	3	1640	3
3	1205		1280		1430		1460		1440		1610	
5	1320		1340		1490		1540		1460		1630	
6	»	6	»	6	»	6	»	6	»	6	»	6
7	1200		1220		1420		1500		1350		1590	
9	1180		1220		1360		1440		1330		1580	
11	1230		1310		1480		1520		1430		1650	
13	1360	15	1400	15	1530	15	1610	15	1490	15	1670	15
15	1170		1330		1340		1500		1410		1560	
19	1040		1320		1470		1520		1400		1620	
23	1020	charbon	1450	charbon	1610	charbon	1640	charbon	1530	charbon	1710	charbon
34	Mort en 20 heures.		Survit.		Survit.		Survit.		Survit.		Mort en 4 jours.	
			1620 charbon		1810 charbon		1710 charbon		1760 charbon			
			Survit.		Survit.		Mort en 7 jours 1/2		Survit.			

Dans cette expérience, le 23^e jour, les 6 lapins reçurent chacun 1/3 de c. c. d'une culture de charbon en bouillon âgée de 24 heures. Trois témoins furent inoculés en même temps avec la même quantité de cette culture. Les témoins moururent : le premier en 26 heures, le second en 28 heures; à ce moment le troisième était déjà très malade, sa température était de 35°2 et il était mort 33 heures après l'inoculation.

Des 6 lapins de l'expérience XII inoculés ce jour, le 1^{er} est mort en 20 heures, le 6^e est mort en 4 jours, les 4 autres ont survécu.

Le 34^e jour, les 4 lapins survivants furent inoculés de nouveau, chacun avec 1/3 c. c. d'une culture de charbon en bouillon âgée de 24 heures. Deux lapins témoins reçurent la même dose. Le premier de ceux-ci mourut en 28 heures, le second en 33 heures. Des lapins de l'expérience, le quatrième mourut 7 jours et demi après cette seconde inoculation, les 3 autres survécurent.

Dans cette expérience, on remarquera que le premier lapin, d'après sa courbe de poids, paraissait être encore sous l'influence nocive de la toxine au moment où il a été inoculé avec du charbon; le sixième lapin, qui n'a pas résisté non plus à cette première

inoculation de charbon, avait montré, d'après les poids, une certaine insensibilité à la toxine; il en est un peu de même du quatrième qui n'a pas résisté à la seconde inoculation. Peut-être est-il nécessaire que les animaux, pour être immunisés contre la maladie microbienne, aient eu une phase malade dans la période de préparation. Aussi, dans l'expérience suivante, j'ai varié les doses suivant chaque animal, attendant, pour donner une nouvelle dose, que l'animal soit en voie de rétablissement. De même, je n'ai inoculé le charbon à un lapin qu'après avoir trouvé une dose de toxine ayant exercé une certaine action sur l'animal en expérience, action se manifestant par une perte de poids de plus de 100 grammes. L'expérience suivante, faite en tenant compte de ces deux remarques, a donné de meilleurs résultats que ceux de l'expérience XII.

Dans cette expérience XIII, les quantités de toxine inoculées à chaque lapin sont indiquées de la même façon, en milligrammes dans la seconde colonne se rapportant à chaque animal.

EXPÉRIENCE XIII

JOURS	1 ^{er} LAPIN		2 ^e LAPIN		3 ^e LAPIN		4 ^e LAPIN		5 ^e LAPIN		6 ^e LAPIN		7 ^e LAPIN	
	POIDS	INOCU- LATIONS	POIDS	INOCU- LATIONS	POIDS	INOCU- LATIONS	POIDS	INOCU- LATIONS	POIDS	INOCU- LATIONS	POIDS	INOCU- LATIONS	POIDS	INOCU- LATIONS
1	1760	3,5	1840	3,7	1840	3,7	1860	3,7	1880	3,7	1960	3,9	1960	3,9
3	1740		1840		1740		1860		1750		1720		1990	
5	1620		1800		1730		1790		1770		1780		1970	
7	1740	6	1820	8	1810	6	1850	7	1840	6	1820	6	1970	10
9	1720		1820		1820		1800		1690		1760		1860	
11	1650		1800		1700		1720		1630		1720		1920	25
13	1880		1860	20	1760		1750		1780		1840	10	1760	
15	1610		1730		1840	10	1860	15	1900	10	1680		1630	
17	1660		1690		1810		1770		1750		1680		1660	
19	1770	10	1520		1780		1760		1840		1800	20	1740	
21	1710		1580		1820	20	1840	30	1880	20	1750		1910	40
26	1830	20	1880	30	1670		1690		1600		1790		1520	
28	1780		1740		1750		1650		1660		1920	35	1800	
31	1790		1760		1800		1780		1820		1740		1540	
32	1840	charbon	1820	charbon	1870	charbon	1820	charbon	1850	30	1660		1540	
	Survit.		Meurt en		Survit.		Survit.							
36			5 jours.						1870		1780		1940	40
40			—						1840		1930	charbon	1790	
44	2020	charbon	—		1940	charbon	1860	charbon	1880	charbon	Survit.		1850	
	Survit.				Meurt en		Survit.		Survit.					
48			—		3 jours.						2080	charbon	1900	
50			—		—								1880	charbon
54	2200	charbon	—		—		1910	charbon	1950	charbon	Survit.		Survit.	
60			—		—								1960	charbon
74	Survit.		—		—		Survit.		Survit.		Survit.		Survit.	

Dans cette expérience, le charbon a été donné aux animaux à la dose de $1/3$ c. c. d'une culture en bouillon âgée de 24 heures. Chaque fois, deux lapins témoins recevaient la même dose. Les 14 témoins sont tous morts entre 20 heures et 38 heures.

Ainsi sur les 13 lapins des expériences XII et XIII, 8 seulement ont survécu. Mais, avant de procéder comme dans la dernière expérience, j'avais fait de nombreux essais dont quelques-uns se rapprochaient des conditions de ces deux expériences. Les résultats n'en ont pas été aussi favorables, puisque, sur 16 lapins traités avec de la toxine de diverses façons et inoculés ensuite avec du charbon, j'ai eu :

5 lapins morts entre 15 et 36 heures, c'est-à-dire dans des temps équivalents à ceux des témoins et même quelques-uns dans des temps moindres. Ces lapins avaient reçu en dernier lieu des doses de toxine un peu fortes (40 milligrammes) et ils ont été inoculés avec du charbon entre le 2^e et le 6^e jour après l'injection de la toxine.

2 lapins morts en 2 jours et demi. L'un avait encore de la diarrhée au moment de l'inoculation du charbon ; le second avait reçu 4^{mgr},5 de toxine le premier jour et 10^{mgr} le 8^e, puis $1/3$ c. c. de culture de charbon le 9^e jour.

3 lapins morts en moins de 3 jours. Ils avaient reçu tous trois : 12^{mgr} de toxine le 1^{er} jour, 30^{mgr} le 6^e jour et 50^{mgr} le 11^e jour, toxine préparée par la première méthode. Ils ont été inoculés avec du charbon : le 1^{er} après 3 jours, le 2^e après 5 jours, le 3^e après 7 jours.

1 lapin mort en 3 jours et demi. Toxine : 4^{mgr} le 1^{er} jour, 4^{mgr} le 6^e, 40^{mgr} le 11^e. Baisse de poids 90 grammes.

1 lapin mort en 5 jours. Toxine 1^{re} méthode : 5^{mgr} le 1^{er} jour, 20^{mgr} le 6^e, 50^{mgr} le 12^e jour. Charbon le 22^e jour.

1 lapin mort en 9 jours. Toxine : 2^{mgr} le 1^{er} jour, 5^{mgr} le 7^e jour, 10^{mgr} le 12^e jour, 15^{mgr} le 15^e jour, 25^{mgr} le 25^e jour. Charbon le 50^e jour.

3 lapins ont résisté à la première inoculation de charbon. Ces 3 lapins survivants reçurent de nouveau, chacun $1/3$ c. c. d'une culture de charbon de 24 heures, 14 jours après la première inoculation. Deux survécurent.

J'ai fait les autopsies de ces 14 lapins ainsi que de ceux qui ont succombé dans les expériences XII et XIII ; tous ces animaux

étaient bien morts du charbon ; le sang contenait en général peu de microbes ; la rate était augmentée de volume, noire, et contenait une assez grande quantité de bactéries. Le sang du cœur de plusieurs de ces animaux a été inoculé à des cobayes ; ces cobayes moururent entre 36 et 60 heures.

Quelques-uns des animaux, qui avaient résisté à l'inoculation d'une seule dose de toxine un peu considérable, furent inoculés avec du charbon dès qu'ils ont semblé remis des conséquences de l'injection de toxine. Ces animaux sont le 70-97 du tableau I, les 24-50, 30-51, 40-69, 60-97 du tableau II. De ces 5 lapins ainsi traités, deux seulement ont survécu : le 30-51 et le 60-97 du tableau II. Ils n'ont résisté ni l'un ni l'autre à une nouvelle inoculation de charbon faite 20 jours après la première.

J'ai aussi essayé d'immuniser des lapins contre la maladie microbienne avec de très faibles quantités de toxine, variant entre 0^{mgr},05 et 0^{mgr},15 pour des lapins dont les poids étaient compris entre 1300 et 1600 grammes. Cette dose était donnée en une seule fois et l'animal était ensuite inoculé avec du charbon. Le charbon était ainsi donné de 2 heures à 12 jours après l'inoculation de la toxine. Je n'ai pu constater dans ces conditions la moindre survie de l'animal.

Le même essai a été tenté avec des souris en leur inoculant de 0^{mgr}02 à 0^{mgr}04 de toxine, et leur injectant, 6 heures après, 2 gouttes d'une culture virulente de charbon. Les souris témoins sont mortes en 22 heures, 25 heures, 27 heures, 32 heures. Les souris, préalablement inoculées avec la toxine, sont mortes en 24 heures, 25 heures, 27 heures, 27 heures et demie, 28 heures, 29 heures, 30 heures ; la huitième était morte 43 heures après l'inoculation.

Il ne peut y avoir eu de survie que pour cette dernière souris ; et ici les résultats ont été inférieurs à ce que m'a donné une expérience identique faite en inoculant à des souris, au lieu de ces doses de toxine, 1 c. c. d'une solution d'extrait de viande de Liebig à 5 0/0¹.

Voici l'expérience :

1. M. KURT MULLER (Der Milzbrand der Ratten, in *Fortschritte der Medicin* 1^{er} juillet 1893) a donné à des rats, au moyen de l'extrait de viande de Liebig, une survie sur les témoins quand il les inoculait avec du charbon.

Expérience. — 8 souris sont inoculées avec 2 gouttes d'une culture virulente de charbon, 4 heures après avoir reçu chacune 1 c. c. d'une solution d'extrait de viande de Liebig à 50/0.

Les souris témoins meurent en : 20 heures, 22 heures, 28 heures, 29 heures.

Les souris traitées sont mortes en 24 heures, 31 heures, de 34 à 42 heures, 46 heures, 52 heures; 2 sont mortes entre la 57^e et la 67^e heure, la dernière meurt après 93 heures.

Toutes ces souris sont bien mortes du charbon; un cobaye inoculé avec du sang de celle qui est morte en 93 heures, a succombé au bout de 60 heures.

L'extrait de viande de Liebig, inoculé aux lapins en grande quantité quelque temps avant une dose mortelle de charbon, peut de même leur donner une survie, souvent considérable, sur les lapins témoins.

J'ai encore fait des tentatives d'immunisation au moyen d'inoculations répétées de doses de toxine variant entre 0^{mgr},1 et 1^{mgr}. Tous ces essais ont échoué.

La méthode qui m'a réussi dans quelques cas pour immuniser des animaux avec de la toxine préparée à basse température m'a donné, avec la toxine extraite des cultures faites à 36°, seulement quelques jours de survie (9 jours au plus) des animaux traités sur les animaux témoins. Peut-être les doses de cette toxine que j'ai employées étaient-elles trop faibles.

De même, avec de la toxine préalablement chauffée à 110°, je ne suis pas arrivé à immuniser complètement un seul lapin contre le charbon.

La conclusion de ces tentatives est qu'il est possible d'immuniser des lapins contre le charbon au moyen de la toxine produite par la bactériidie. Mais, l'immunisation est toujours pénible à obtenir. Elle nécessite l'emploi de doses de toxine convenablement graduées et légèrement variables avec chaque cas particulier: les animaux peu sensibles à la toxine devant en recevoir de plus grandes quantités. On s'arrêtera quand les animaux seront accoutumés à des doses de 20 à 30 milligrammes au moins (toxine 2^e méthode, voir tableau III). Les lapins ainsi préparés pourront généralement recevoir sans danger une dose mortelle de charbon à partir du 10^e jour suivant la dernière inoculation de toxine. Il y a avantage à augmenter ce délai de 10 jours si la dernière dose de toxine a dépassé 25 à 30 milligrammes.

Essai sur les rats blancs. — Avec de la toxine extraite des cultures à 20°, j'ai tenté de rendre des rats blancs réfractaires au charbon. Les résultats obtenus n'ont pas été aussi favorables qu'avec les lapins.

Voici l'expérience :

Expérience. — 9 rats blancs reçoivent chacun :

Le 1^{er} jour 0^{mgr},6 de toxine;
 7^e jour 1 milligramme de toxine;
 12^e jour 1^{mgr},6 de toxine;
 18^e jour 2^{mgr},5 de toxine;
 24^e jour 3 milligrammes de toxine;
 29^e jour 5 — de toxine;
 36^e jour 6 — de toxine à 4 rats seulement (1^{er} lot);
 40^e jour 8 — de toxine à 4 autres rats (2^e lot).

Le 9^e rat, inoculé le 36^e jour avec du charbon, est mort presque en même temps qu'un rat témoin.

Les 8 rats survivants (1^{er} et 2^e lots réunis) reçurent le 50^e jour chacun 1/4 c. c. d'une culture de charbon en bouillon âgée de 24 heures. La même quantité fut inoculée à 3 rats blancs témoins.

Les témoins moururent en 45 heures, 48 heures et 69 heures.

Les rats du 2^e lot sont morts l'un en 42 heures et les 3 autres entre la 50^e et la 60^e heure.

Du 1^{er} lot, il ne mourut que deux rats : l'un en 68 heures, l'autre en 90 heures.

Le 59^e jour, chacun des 2 rats survivants de ce premier lot reçut 7 milligrammes de toxine.

Le 70^e jour, je leur inoculai 1/4 c. c. d'une culture de charbon, dose qui tua les témoins en 1 jour et demi et 2 jours. Tous deux résistèrent. Ils survécurent également à une troisième inoculation de charbon qui leur fut faite le 81^e jour.

Le 88^e jour, un des deux survivants reçut de nouveau 7 milligrammes de toxine, puis tous deux furent inoculés le 100^e jour avec une dose de charbon qui tua un témoin en 1 jour et demi. Seul le rat qui avait reçu une nouvelle dose de toxine le 88^e jour résista. L'autre mourut en 2 jours et demi.

DIFFÉRENCIATION DE LA TOXINE ET D'AUTRES SUBSTANCES ÉGALEMENT PRÉCIPITABLES PAR LE SULFATE D'AMMONIAQUE

J'ai retiré des cultures de charbon, faites à basse température dans une solution de peptone, une matière dont les effets physiologiques doivent être attribués au développement de la bactériodie dans ce milieu. On n'a pas, en effet, les mêmes résultats en inoculant à des animaux, d'une part la toxine, et d'autre part la solution de peptone avant toute culture.

D'après ce qu'on a vu, les effets dus à cette toxine ont certaines ressemblances avec les phénomènes produits par d'autres toxines. Il y a aussi une certaine analogie avec ceux que donnent certains corps précipitables par le sulfate d'ammoniaque et qu'on désigne sous le nom de propeptones. Ces propeptones sont associées à la peptone dans le produit commercial de ce nom et il est très difficile d'après Kühne de séparer complètement les peptones des propeptones : la précipitation par le sulfate d'ammoniaque à chaud n'est en effet pas complètement suffisante pour éliminer toute trace des propeptones. On pouvait alors se demander si les effets observés lors de l'inoculation de la toxine ne tiendraient pas à de la propeptone non éliminée du milieu de culture, ou encore si la toxine elle-même ne serait pas cette substance faite aux dépens de la peptone par la bactériodie dans le milieu de culture.

Les animaux inoculés soit avec ces propeptones, soit avec la toxine que j'ai préparée ont des oscillations de la température (toujours avec la propeptone et très souvent avec la toxine), et aussi un abaissement du poids amenant pour des doses convenables la mort de l'animal par cachexie.

Pour les deux substances également, on a la possibilité d'accoutumer peu à peu les animaux à en recevoir de grandes doses. Le contact des hypochlorites diminue également l'activité de toutes deux.

Mais ce sont là des propriétés communes à beaucoup d'autres corps et il ne me semble pas qu'on pourrait conclure de là l'identité des propeptones et de cette toxine.

Au contraire, la similitude des phénomènes est loin d'être parfaite. J'ai déjà montré combien les caractères chimiques sont différents pour les deux substances. De plus, les propeptones

ont la propriété de rendre incoagulable le sang des animaux auxquels on les injecte en quantité suffisante ; or, je n'ai jamais observé ce fait avec la substance que j'ai préparée.

Pour les lapins, les doses mortelles de ces propeptones sont très notablement supérieures aux doses mortelles de toxine charbonneuse extraite des cultures à basse température.

On peut habituer peu à peu des lapins à recevoir de grandes quantités de propeptones ; aucun des animaux ainsi préparés ne résiste au charbon.

En outre, les lapins ayant l'immunité contre la toxine ne l'ont pas pour la propeptone ; et inversement, des lapins, accoutumés à des doses de propeptone atteignant 500 milligrammes, manifestent une sensibilité très marquée à des doses de toxine ne dépassant pas 10 milligrammes par kilogramme d'animal.

Cette toxine est particulière à la bactériémie, elle est due exclusivement à la culture du charbon dans ce milieu. Pour le montrer, j'ai cherché si d'autres microbes pathogènes, se développant bien dans la solution de peptone et dans ces conditions, donnaient de même une substance identique à la toxine charbonneuse.

Parmi ceux que j'ai essayés, le streptocoque m'a donné une culture suffisante pour que je puisse tenter d'en retirer une toxine. Par le même procédé que pour les cultures de charbon, on retire de ces cultures une substance pulvérulente, toxique pour le lapin à la dose de 40 milligrammes pour le streptocoque dont je me suis servi. Les animaux peuvent également acquérir l'accoutumance à cette nouvelle substance. Dans une expérience faite sur 6 lapins j'ai donné à ceux-ci des doses croissantes de toxine du streptocoque, en employant les précautions qui m'avaient réussi dans l'expérience XIII.

Les animaux étant ainsi préparés, l'un reçut dans une veine de l'oreille $1/10$ c. c. d'une culture du streptocoque qui avait servi à ensemercer les ballons de peptone ; un lapin témoin reçut de la même façon une quantité identique de la culture de streptocoque. Le témoin mourut en 1 jour et demi, l'autre survécut. Ce dernier fut inoculé avec du charbon 15 jours plus tard et mourut charbonneux en 20 heures.

Des cinq autres lapins accoutumés à la toxine du streptocoque, 2 reçurent chacun 20 milligrammes par kilogramme de toxine

charbonneuse et moururent l'un en 4 jours, l'autre en 11 jours et demi. Les 3 derniers furent inoculés avec du charbon et moururent, l'un avant les 2 lapins témoins, les autres en même temps que les témoins.

CULTURES DANS UN MILIEU DE SÉRUM LIQUIDE

Les cultures dans un milieu de peptone ayant donné une toxine ayant les propriétés qui viennent d'être indiquées, j'ai cherché si la bactériodie produisait également une toxine dans d'autres milieux de culture.

Le sérum de sang de bœuf est un excellent milieu de culture pour la bactériodie. Mélangé avec deux parties d'eau et alcalinisé légèrement avec de la soude, il peut être stérilisé par un chauffage à 115° sans se coaguler.

Ce milieu, inoculé aux animaux, n'est nullement toxique et quelles que soient les doses auxquelles je l'ai employé, il ne m'a jamais donné. pour les animaux en expérience, le moindre degré d'immunité.

Les ballons de sérum sont ensuite ensemencés avec du charbon virulent ¹.

La bactériodie se développe très rapidement dans ce milieu et à 36°, donnant une abondante culture. Quinze jours environ après l'ensemencement, cette culture était filtrée sur porcelaine et inoculée à des lapins sous la peau du dos. Les quantités données à chaque animal ont varié, depuis un demi-centimètre cube, une fois donné, jusqu'à 25 c. c. inoculés plusieurs jours de suite. Après un intervalle de temps qui a été de deux jours à un mois, les animaux ont reçu une petite quantité d'une culture virulente de charbon.

Les doses inférieures à 40 c. c. ne m'ont pas semblé avoir une grande influence ni sur le poids, ni sur la température de l'animal. Quand il y a eu une perte de poids, celle-ci n'a pas excédé 80 grammes, cette diminution de poids a d'ailleurs été rare. L'élévation de la température pour ces petites doses a toujours été faible.

Si l'on donne au lapin une dose de culture supérieure à 40 c. c., la réaction de l'animal se manifeste par de plus grandes

1. Voir la définition de cette virulence, page 7.

variations de la température et aussi par une baisse de poids très marquée.

En même temps que ces phénomènes se manifestent du côté de la température et du poids, l'animal a une diarrhée souvent assez forte. D'ordinaire, le lapin se rétablit assez vite, mais il n'en est pas toujours ainsi.

Voici le résumé d'une expérience où la température s'est maintenue longtemps élevée et où la perte de poids a atteint 300 grammes..

Expérience. — Lapin de 1,825 grammes, température 39°, 6; reçoit 11 c. c. de culture filtrée.

1 ^{er} jour	matin 40° 1	soir 40° 7	
2 ^e jour	matin 41° 4	soir 40° 5	poids 1,580
3 ^e jour	—	soir 40° 4	
4 ^e jour	—	soir 40° 2	poids 1,610
5 ^e jour	matin 39° 7	soir 40° 7	
6 ^e jour	matin 40° 5	soir 39° 8	
7 ^e jour	matin 39° 9	—	poids 1,525
8 ^e jour	matin 39° 8	—	
10 ^e jour	—	—	poids 1,650
11 ^e jour	matin 39° 8	soir 40° 3	
12 ^e jour	matin 40° 6	soir 40° 2	poids 1,540
13 ^e jour	matin 40° 4	soir 40° 5	
14 ^e jour	matin 40°	soir 40° 3	poids 1,560
15 ^e jour	matin 39° 7	soir 40° 1	
16 ^e jour	matin 39° 9	—	poids 1,610

A partir de ce moment-là, l'animal augmente de poids, d'abord très lentement, puis plus rapidement à partir du 26^e jour. Il a eu la diarrhée du 4^e au 24^e jour.

Quand l'animal en expérience est en voie de rétablissement, l'inoculation d'une deuxième dose de culture produit de même une élévation de température et une diminution de poids.

Cette nouvelle réaction de l'animal est d'autant plus accentuée que la différence des doses des première et seconde inoculations a été plus grande.

Ce même effet se reproduit lors d'une troisième et d'une quatrième inoculations; mais, en augmentant progressivement les doses, on peut arriver à n'avoir de la part de l'animal que des réactions très faibles.

Les lapins peuvent être ainsi amenés peu à peu à recevoir

sous la peau, plusieurs jours de suite, 25 c. c. de culture sans avoir de grandes élévations de température et en ne subissant que de faibles pertes de poids.

Aux doses où les inoculations ont été faites, il ne m'a pas semblé que ces cultures filtrées fussent bien toxiques puisque, sur 35 animaux qui ont reçu diverses quantités de ce liquide, je n'en ai perdu que 3 : le premier en 4 jours à la suite de l'injection de 11 c. c. de culture et sans que la température se soit élevée beaucoup (39°, 3 à 40°, 5); le deuxième est mort dans la nuit qui a suivi l'inoculation de 3 c. c. de culture, le troisième est mort 7 jours après l'injection de 20 c. c. Les 32 autres lapins ont résisté à des doses soit moindres, soit égales, soit supérieures.

Ces lapins, ainsi traités préventivement, ont reçu, après des temps qui ont varié de deux jours à un mois, mais le plus généralement du 6^e au 15^e jour suivant la dernière inoculation de culture filtrée, 1/3 c. c. d'une culture de charbon virulent âgée de vingt-quatre heures. Tous sont morts, et cela à peu près dans le même temps que les lapins témoins. Une fois, j'ai eu une survie de quarante-huit heures; mais un second lapin, qui avait reçu les mêmes doses de culture, est mort au contraire très rapidement.

En cultivant la bactériodie plus longtemps dans ce sérum avant de filtrer sur porcelaine, je n'ai pas obtenu de meilleurs résultats.

En résumé, je n'ai pas réussi à mettre nettement en évidence dans ce milieu une sécrétion toxique ou immunisante du *Bacillus Anthracis*.

TOXINE EXTRAITE DES MICROBES CULTIVÉS SUR MILIEU SOLIDE

Seules, jusqu'ici, les cultures sur peptone m'ont donné de la toxine. Je n'ai pu réussir à mettre cette substance en évidence, ni dans les cultures sur sérum, ni dans les cultures faites dans une bouillie de viande de cheval; les cultures faites avec du bouillon de veau ne m'ont pas fourni de meilleurs résultats.

Pourtant, dans chacun de ces derniers milieux, les cultures obtenues étaient beaucoup plus belles que celles faites dans le milieu de peptone.

J'ai cherché également à extraire des bactériidies cultivées sur milieu solide une toxine analogue à celle que je retirais des cultures sur peptone.

Pour cela, j'aiensemencé soit sur des pommes de terre, soit sur de la gélose nutritive, du sang d'un lapin tué par du charbon asporogène. Deux jours plus tard, les microbes sont enlevés avec une spatule et mis à macérer dans de l'alcool à 20° additionné de quelques gouttes d'éther. Après vingt-quatre heures au moins de contact, le liquide filtré était soumis à l'action de la l'alcool fort. On obtient ainsi un coagulum plus ou moins abondant. Le précipité est séparé par filtration, lavé à l'alcool absolu puis à l'éther; après quoi il est séché dans le vide en présence de l'acide sulfurique.

Je recueille ainsi une substance pulvérulente, agissant de la même façon que la toxine retirée des cultures dans le milieu de peptone. Ces deux produits m'ont semblé avoir à peu près la même activité. Inoculés aux animaux, ils produisent tous deux des phénomènes semblables; pour une dose suffisante, les lapins meurent cachectiques en présentant les mêmes symptômes dans les deux cas.

ORIGINE DE LA TOXINE

Il résulte de ce qui précède, que la toxine est primitivement contenue à l'intérieur des bacilles. Elle s'en échappe ensuite peu à peu par dialyse, quand les microbes se trouvent au contact de certains liquides comme l'alcool à 20° ou encore le milieu de peptone.

J'ai dit que le sérum du sang de bœuf n'acquerrait pas de propriété toxique bien manifeste par la culture du charbon. La toxine ne se trouvant pas ici dans le liquide, je l'ai alors cherchée pour les cultures de charbon asporogène dans les bactéries qui avaient poussé dans ce sérum. Pour cela, une fois la culture bien développée, je la filtrais d'abord sur papier, puis sur une bougie Chamberland. J'ai donné les résultats fournis par le liquide filtré sur porcelaine. Le filtre de papier avait retenu une grande partie des microbes. Il était mis à macérer dans l'alcool à 20° pendant vingt-quatre heures au moins. Puis je filtrais et le liquide filtré était mis au contact de 4 fois son volume d'alcool

fort. Le précipité qui se formait ainsi était séparé par filtration, lavé à l'alcool absolu, puis à l'éther et enfin séché dans le vide en présence de l'acide sulfurique.

Inoculée à des lapins, la substance ainsi préparée tuait ces animaux à des doses de 40 milligrammes par kilogramme. Les animaux maigrissent beaucoup et se cachectisent peu à peu.

Voici, comme exemple de cette action, l'expérience :

Expérience. — Lapin de 4,750 grammes, reçoit 70 milligrammes de cette substance. Les poids du lapin, pris le lendemain, puis tous les trois jours, ont été successivement :

1 ^{er} jour	4,760	4,680	4,600	4,670
43 ^e jour	4,580	4,410	4,070	

Ce lapin est mort le 20^e jour et pesait 4020 grammes. A l'autopsie la rate n'était pas augmentée de volume; les ensemencements faits dans du bouillon et sur de la gélose nutritive avec du sang, de la pulpe de foie, de la pulpe de rate sont restés stériles.

Les autopsies des autres lapins, morts par suite de l'inoculation de cette même substance, ont donné des résultats identiques.

Pour les cultures dans le milieu de peptone, les résultats de l'inoculation aux animaux de la toxine extraite du milieu sont différents suivant que la culture a été faite à 36° ou à basse température. J'ai opéré avec les microbes de chacune de ces deux sortes de culture asporogène comme avec les bactéries qui avaient poussé sur sérum. La macération dans l'alcool faible, puis la précipitation par l'alcool fort m'ont donné de même deux nouvelles substances.

Elles ont été inoculées à des lapins. Les expériences que j'ai faites de cette façon sont trop peu nombreuses pour en tirer des conclusions bien formelles. J'ai constaté que l'extrait des bactéries qui ont cultivé à la température de 20° ne produit pas grand effet aux animaux. Le cas le plus favorable m'a donné chez un lapin de 4,940 grammes une perte de poids inférieure à 60 grammes pour l'inoculation d'une dose de ce produit égale à 240 milligrammes, soit 108 milligrammes par kilogramme.

Au contraire, la substance provenant des microbes développés à 36° conserve une certaine activité qui s'est manifestée sur les animaux par de l'amaigrissement marqué. Sur quatre lapins

inoculés, un est mort pour une dose de 80 milligrammes par kilog.

Par conséquent, la comparaison de ces cultures faites dans le même milieu, à deux températures différentes, nous donne : pour la culture faite à 36°, un liquide faiblement toxique et des microbes ayant conservé à leur intérieur une notable quantité de toxine ; pour la culture faite à 20°, un liquide contenant une grande quantité de toxine et des bacilles chez lesquels il m'a été impossible de révéler la moindre trace de toxine. A cette température de 20°, la bactériodie est certainement dans de mauvaises conditions d'existence. Probablement beaucoup d'individus meurent avant que les cultures soient traitées pour l'extraction de la toxine, laissant ainsi diffuser dans le liquide de culture la totalité des poisons qu'ils renfermaient.

Ainsi, il existe dans le *Bacillus anthracis* une toxine ; mais celle-ci reste contenue à l'intérieur du microbe dans le plus grand nombre des milieux où se développe la bactériodie.

M. le professeur Duclaux pense que les toxines sont excrétées par les microbes quand ceux-ci se trouvent dans des conditions défavorables d'existence¹.

Il me semble que les expériences que je viens de rapporter pourraient être interprétées dans ce sens. A la température de 36°, la bactériodie donne dans le sérum de sang de bœuf de très belles cultures, mais le milieu ne contient pour ainsi dire pas de toxine. A la température de 20°, les cultures dans une solution de peptone se font lentement et sont maigres ; par contre, on retire de cette solution une toxine active.

Il en est de même pour les cultures faites dans le bouillon à la température de 36°. Ces cultures ne sont nullement toxiques et n'amènent pas la moindre perte de poids des animaux en expérience.

Le fait de la moindre toxicité du milieu de peptone, quand le développement de la bactériodie s'y fait en présence d'une grande quantité d'air fréquemment renouvelée, tient peut-être, non à de meilleures conditions de vie du microbe mais à une oxydation

1. M^r A. FERNBACH a déjà montré que pour l'*Aspergillus niger*, le passage de la sucrase à l'extérieur des cellules subit l'influence d'un état de souffrance de ces cellules.

A. FERNBACH, Recherches sur la sucrase, diastase inversive du sucre de canne. (*Thèse doct. ès sciences*, 1890, p. 50.)

de la toxine, oxydation qui diminuerait l'activité de cette substance.

La toxine que j'ai préparée, renfermant probablement beaucoup de matières étrangères entraînées mécaniquement lors de sa préparation, il m'a semblé illusoire de chercher à quelle classe de corps elle pourrait appartenir au point de vue chimique.

CONCLUSIONS

En cultivant à basse température la bactériodie charbonneuse dans des solutions de peptone glycinée, on peut extraire du milieu de culture une toxine particulière à la bactériodie.

Cette toxine n'a pas les réactions connues des matières albuminoïdes; en outre, elle ne transforme ni l'empois d'amidon, ni les solutions de sucre de canne, ni les solutions de glycogène.

Inoculée aux animaux sensibles au charbon, elle amène, à certaines doses, la mort de l'animal par cachexie.

Les animaux réfractaires à la maladie microbienne (poules, grenouilles, poissons) paraissent être presque indifférents à la toxine. Il semble en être de même des lapins immunisés contre le charbon par des virus atténués.

Cette substance est atténuée, mais non complètement détruite, par le chauffage à 110°, différant ainsi du venin des serpents, des toxines tétanique et diphtérique et des corps que l'on range sous le nom de diastases.

Au contraire, de même que les toxines microbiennes précé-
dentes, elle perd son action sur les animaux si on la met au contact des hypochlorites alcalins. L'insolation prolongée en présence de l'air amène le même résultat.

En employant des doses convenables et graduées de toxine charbonneuse, on peut arriver à immuniser des animaux contre le charbon, de même qu'avec les autres toxines on arrive à donner l'immunité contre les maladies correspondantes.

Les cultures de charbon dans d'autres liquides tels que le sérum de sang de bœuf, les bouillons de viandes de cheval, de bœuf ou de veau ne contiennent pas de toxine d'une façon appréciable.

Par contre, on peut extraire des cultures de charbon sur gélose nutritive une toxine, en faisant macérer dans de l'eau alcoolisée les microbes qui ont poussé sur ce milieu.

L'apparition de la toxine charbonneuse dans un milieu dépend donc d'une manière très étroite des conditions d'existence qui sont données à la bactérie dans ce milieu. Quand ces conditions se trouvent réalisées, la toxine, contenue à l'intérieur des microbes, diffuse à l'extérieur dans les liquides en présence desquels se trouvent les bacilles charbonneux.

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

BOTANIQUE

Les organismes à nitrification.

GÉOLOGIE

Formation et principaux mouvements orogéniques
de la chaîne du Jura.

VU ET APPROUVÉ,

Paris, le 17 mai 1895.

Le doyen de la Faculté des Sciences,

G. DARBOUX.

VU

ET PERMIS D'IMPRIMER.

Paris, le 17 mai 1895.

Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris,

GRÉARD.

